

Faculdade de Farmácia
UNIVERSIDADE DO PORTO
Mestrado em Controlo de Qualidade



**Evolução do teor de aminas biogénicas
ao longo do fabrico e armazenamento de 2 formulações de
enchidos secos curados**

Correlação com parâmetros de estabilidade
e indicadores de proteólise

FACULDADE DE FARMACIA
U. P.
BIBLIOTECA
Data 01/09/18
Reg 1522
Cota

FFM
JUD

Inês Catarina da Silva Miguel Judas
Porto, 2000

Trabalho de dissertação apresentado na Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto para obtenção do grau de **Mestre em Controlo de Qualidade na área científica Água e Alimentos** (Decreto-Lei 216/92, I Série – A, de 13 de Outubro e Resolução nº 8/SC/SG/93, D.R. II Série nº 126, de 31 de Maio de 1993).

Trabalho realizado no
Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da
Universidade do Porto
e na
Secção de Indústrias Alimentares da
Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro

Sob a orientação:

Professora Doutora Maria Beatriz Prior Pinto Oliveira

Co-orientação:

Professora Doutora Margarida Alice Ferreira

Este trabalho foi objecto, das seguintes publicações científicas:

“Processamento de enchidos secos curados”.

I. Judas; M.B.P.P. Oliveira e M.A. Ferreira.

Alimentação Humana, 2000. Vol.6, Nº1: 63-76.

“Aminas biogénicas – significado da sua presença em enchidos secos curados”.

I. Judas; M.B.P.P. Oliveira; J.O. Fernandes e M.A. Ferreira.

Artigo submetido.

AGRADECIMENTOS

Pela valiosa contribuição para a realização deste trabalho, gostaria de manifestar o mais sincero agradecimento:

À Professora Doutora Beatriz Oliveira, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, pela orientação, motivação, permanente disponibilidade, incentivo e amizade, bem como pela revisão deste trabalho de dissertação.

À Professora Doutora Conceição Martins, da Secção de Indústrias Alimentares da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro (UTAD), pela sugestão do tema do trabalho, por ter disponibilizado o laboratório da Secção de Indústrias Alimentares da UTAD para a realização de parte do trabalho experimental desta dissertação e pela amizade com que sempre me distinguiu.

Ao Eng.º Luís Patarata, da Secção de Indústrias Alimentares da UTAD, por ter cedido as amostras utilizadas neste trabalho, pela amizade, incansável apoio e disponibilidade que me dispensou, assim como, pela boa disposição contagiante e pelo bom ambiente de trabalho que proporcionou.

À Dra. Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, pela imprescindível ajuda prestada no delineamento e na execução do trabalho laboratorial, pela revisão crítica desta dissertação, compreensão, motivação, apoio constante e amizade.

À Professora Doutora Margarida Ferreira, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, pelo seu interesse no trabalho e sugestões científicas prestadas.

Ao Dr. José Fernandes, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, pela incansável disponibilidade, valiosas sugestões, boa disposição e bom ambiente de trabalho que proporcionou.

Aos Drs. Miguel Faria e Duarte Torres, bem como às Dras. Isabel Ferreira, Eulália Mendes e Olívia Pinho, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, pela boa disposição e colaboração demonstrada.

Ao Eng.º António Silva, da Secção de Indústrias Alimentares da UTAD, pela amizade, incansável apoio e disponibilidade que me dispensou.

Ao Sr. Felisberto Borges, Sras. Ana Leite e Lúcia Ribeiro, da Secção de Indústrias Alimentares da UTAD, pela amizade, valiosa colaboração e permanente acompanhamento do trabalho laboratorial, assim como pelo excelente ambiente de trabalho que sempre me proporcionaram.

À Dr^a Ema Proença, à D. Irene Lopes, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia do Porto, agradeço a forma acolhedora como me receberam e a colaboração na parte experimental.

Aos meus amigos e colegas, que de uma forma ou de outra me ajudaram a concluir este mestrado, pela amizade, disponibilidade, apoio e incentivo constantes.

À minha família, especialmente aos meus pais e irmã, pelo carinho, apoio incondicional e compreensão pelas minhas ausências prolongadas.

Ao Miguel por tudo.

Aos meus pais

Ao Miguel

Resumo**Abstract****Lista de abreviaturas****I – Parte Teórica**

Introdução	2
1 – Classificação de enchidos	4
2 – Processo de fabrico de enchidos secos curados	5
2.1 – Selecção dos ingredientes e formulação	6
2.2 – Corte das carnes	12
2.3 – Mistura e repouso da massa	12
2.4 – Enchimento	13
2.5 – Fermentação – 1ª fase da maturação	13
2.6 – Fumagem	15
2.7 – Secagem – 2ª fase da maturação	16
2.8 – Embalagem	17
3 – Evolução das aminos biogénicas ao longo do processamento de enchidos secos curados	18
3.1 – Origem das aminos biogénicas	18
3.2 – Toxicidade das aminos biogénicas	20
3.3 – Teores de aminos em enchidos secos curados	23
3.4 – Factores com influência na formação de aminos	25
3.5 – Inactivação de aminos biogénicas	35
3.6 – Limites legais para a presença de aminos biogénicas	35

II - Parte Experimental

1 – Amostras	38
1.1. Processamento das amostras	38
1.1.1. Selecção dos ingredientes e formulação	38
1.1.2. Corte das carnes	39
1.1.3. Mistura e repouso da massa	39
1.1.4. Enchimento	40
1.1.5. Fermentação – 1ª fase da maturação	40

1.1.6. Fumagem	40
1.1.7. Secagem – 2ª fase da maturação	40
1.1.8. Embalagem	40
1.2. Amostragem	40
1.3. Preparação das amostras	41
2 – Parâmetros analíticos determinados	41
2.1 – Parâmetros indicadores de estabilidade	42
2.1.1 – Actividade da água	43
2.1.2 – pH	43
2.1.3 – Determinação da Humidade	43
2.2 – Parâmetros indicadores de proteólise	43
2.2.1 – Azoto total	44
2.2.2 – Azoto não proteico	44
2.2.3 – Aminoácidos livres	44
2.3 – Aminas biogénicas e poliaminas naturais	45
2.3.1 – Optimização de uma técnica de HPLC para o doseamento de 8 aminas em enchidos secos curados	45
2.3.1.1 – Equipamento	46
2.3.1.2 – Reagentes e padrões	47
2.3.1.3 – Condições cromatográficas	47
2.3.1.4 – Identificação dos compostos	48
2.3.1.5 – Optimização do método	49
2.3.1.5.1 – Processo extractivo	50
2.3.1.5.2 – Condições de derivatização	55
2.3.1.6 – Protocolo seleccionado	64
2.3.1.7 – Validação do método	65
2.3.1.7.1 – Linearidade	65
2.3.1.7.2 – Limites de detecção e de quantificação	68
2.3.1.7.3 – Precisão da extracção	71
2.3.1.7.4 – Recuperação	71
III – Resultados e Discussão	
1 – Parâmetros indicadores de estabilidade	74
1.1. Actividade da água (a_w)	74
1.2. pH	75

1.3. Humidade	77
2- Parâmetros indicadores de proteólise	79
2.1. Azoto Total (NT)	79
2.2. Azoto Não Proteico (NPN)	81
2.3. Índice de Proteólise (IP)	83
2.4. Aminoácidos livres (AA)	85
3. Aminas biogénicas e poliaminas naturais	89
3.1 – Aminas biogénicas	96
3.2 – Poliaminas naturais	107
3.3 – Níveis considerados tóxicos e Índice de Aminas Biogénicas	111
Conclusões	113
Bibliografia	117

RESUMO

Os enchidos secos curados são produtos com grande expressão no mercado português. Durante o seu fabrico e armazenamento, as proteínas e todos os compostos azotados em geral, sofrem uma série de transformações, responsáveis pelo desenvolvimento de características sensoriais desejáveis, mas que também originam compostos indesejáveis como as aminas biogénicas. Estas são tradicionalmente descritas em alimentos sujeitos a processos de fermentação/maturação, como é o caso dos enchidos secos curados, e causam no organismo efeitos fisiológicos e tóxicos distintos sendo também precursoras de substâncias carcinogénicas (Masson *et al.*, 1996a).

Com este trabalho de dissertação pretendeu-se:

- Determinar o teor em aminas biogénicas e estudar a sua evolução ao longo do processamento de um enchido seco curado – linguiça;
- Estudar o efeito da introdução, no fabrico de linguiça, de um aditivo químico acidificante / antioxidante na produção de aminas biogénicas;
- Estudar o efeito que os parâmetros de estabilidade (a_w e pH) e indicadores de proteólise (azoto total, azoto não proteico e aminoácidos livres) têm na produção de aminas e a sua evolução ao longo do processamento das linguiças;
- Optimizar e aplicar uma técnica de HPLC que permita a quantificação simultânea de 8 aminas em enchidos.

Verificou-se que o teor total de aminas aumenta ao longo do processo de fabrico das linguiças e diminui ligeiramente durante o armazenamento. A introdução do aditivo químico acidificante/antioxidante não se mostrou favorável, já que as amostras que o apresentavam continham teores superiores de aminas no produto final, os quais se encontram próximos dos considerados tóxicos para a tiramina e a histamina.

Os produtos acabados apresentaram valores de a_w e de pH suficientes para garantir a sua estabilidade à temperatura ambiente.

Os parâmetros indicadores de proteólise não apresentaram grandes correlações com a produção de aminas ao longo do processo de fabrico / armazenamento das linguiças.

ABSTRACT

Dry cured sausages are products with great expression in the Portuguese market. During their manufacture and storage, the proteins and other nitrogenated compounds suffer a serie of transformations, which causes the development of desirable sensorial characteristics and also originate undesirable compounds as the biogenic amines. These are described traditionally in fermented/ripened foodstuffs, as it is the case of cured dry sausage, and they cause different physiologic and toxic effects in the organism and are precursors of carcinogenic substances.

The aim of this work was:

- To determine the content of biogenic amines and to study its evolution along the cured dry processing of a special type of sausage (linguiça);
- To study the effect of the utilisation, in the manufacture of linguiça, of a mixture of additives with acidifying / antioxidant properties in the production of biogenic amines;
- To study the effect of stability parameters (a_w and pH) and proteolytic indicators (total nitrogen, non proteic nitrogen and free amino acids) on the amines production and its evolution along the processing of the linguiças;
- To optimise and to apply a HPLC methodology that allows the simultaneous quantification of the 8 amines normally described in this type of food.

It was verified that the total content of amines increases along the process of manufacture of the linguiças and it decreases lightly during the storage. The utilisation of the mixture of additives with acidifying / antioxidant properties was not advantageous, since the samples that contained these additives presented superior content of amines. The levels of tyramine and hystamine are close to those considered toxic.

The final products presented a_w and pH values that guarantee its stability at room temperature.

No correlation were found between proteolytic indicators and amines production along the process of manufacture / storage of the sausages (linguiças).

LISTA DE ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µl - Microlitro

µv - Microvolte

AA - Aminoácidos livres

AOAC - Association of Official Analytical Chemists

a_w - Acividade da água

BAI - Índice de aminas biogénicas

BEHPA - bis-2-etilhexilfosfato

C.V. - Coeficiente de variação

C° - Graus centígrados

DFD - Escura, firme, seca

Em. - Emissão

Ex. - Excitação

g - Grama

GC - Cromatografia gasosa

GDL - Glucono-δ-lactona

h - Hora

HPA - Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos

HPLC - Cromatografia Líquida de Alta Resolução

I.S. - Padrão interno

IMOA - Inibidor das mono-aminoxidases

kg - Quilograma

L - Litro

M - Molar

mg - Miligrama

min - Minuto

ml - Mililitro

mM - Milimolar

N - Azoto

nd - Não detectado

NDEA - *N*-nitrosodietilamina

NDMA - *N*-nitrosodimetilamina

nm – Nanómetros

NP – Norma Portuguesa

NPIP – *N*-nitrosopiperidina

NPN – Azoto não proteico

NPYR – *N*-nitrosopirrolidina

NT – Azoto total

p.a. – Pró-análise

PSE – Pálida, tenra, exsudativa

rpm – Rotações por minuto

T - tempo

TCA – Ácido tricloroacético

TDPA – Ácido tiodipropiónico

TLC – Cromatografia em Camada Fina

t_r – Tempo de retenção

uAU – Unidades de absorvância

UFC – Unidades formadoras de colónias

UV- Ultravioleta

I – PARTE TEÓRICA

INTRODUÇÃO

Um enchido é um alimento que se prepara com carne picada e condimentada, sendo-lhe dada, normalmente, uma forma simétrica. A palavra enchido deriva do latim *salsus* que significa salada ou literalmente, carne conservada por salga (Rust, 1994).

A elaboração de enchidos, antes considerada como uma arte, baseia-se actualmente numa ciência altamente sofisticada (Lago, 1997). A indústria, os laboratórios governamentais e mesmo as universidades têm contribuído de forma preponderante para a evolução verificada neste sector. São de mencionar também, as inovações da engenharia mecânica que permitem desenvolvimentos em todas as fases do processo de fabrico, desde a manufactura até ao enchimento, e fazem da elaboração de enchidos uma das áreas mais dinâmicas da indústria cárnea (Rust, 1994).

Em Portugal, o sector da indústria cárnea compreende uma grande variedade de situações que vão desde a escala artesanal até unidades industriais, algumas destas já equipadas com tecnologia moderna. A estrutura do sector de preparação e transformação de carne é predominantemente constituída por pequenas empresas de tamanho artesanal ou familiar. No entanto, o grande mercado é sustentado por grandes ou médias empresas. As pequenas indústrias fornecem os mercados regionais, geralmente com produtos processados de forma tradicional.

A grande maioria das empresas do sector cárneo em Portugal utiliza o porco como matéria-prima de base para o processamento dos produtos, tendo sido produzidas 62700 toneladas só no ano de 1990 (Galdrão, 1991).

Os enchidos secos curados como o chouriço, o salpicão e a linguiça são produtos com uma grande aceitação no mercado por apresentarem características sensoriais muito particulares e porque se mantêm estáveis durante bastante tempo, à temperatura ambiente. Assim, e face às crescentes exigências, quer por parte das autoridades higio-sanitárias, quer por parte do consumidor, torna-se necessário estudar tecnologias, ou a sua aplicação a estes produtos, por forma a garantir a sua qualidade (Esteves *et al.*, 1999).

Durante a maturação dos enchidos, as proteínas e todos os compostos nitrogenados em geral, sofrem uma série de transformações catalisadas por enzimas de origem endógena, próprias da carne, ou de origem exógena, produzidas pela flora microbiana, cuja actividade depende de agentes intrínsecos da carne e da tecnologia aplicada durante a fabricação do produto. Algumas das transformações referidas são responsáveis pelo desenvolvimento de características sensoriais desejáveis nos produtos, outras originam compostos indesejáveis (Diaz *et al.*, 1995). Uns desses compostos são as aminas biogénicas, cujos teores mais elevados são tradicionalmente descritos em alimentos sujeitos a processos de fermentação/maturação, como é o caso dos enchidos secos

curados, e que causam efeitos fisiológicos e tóxicos distintos no organismo, nomeadamente, afectam a pressão sanguínea, desencadeiam reacções alérgicas em indivíduos sensíveis e são precursores de substâncias carcinogénicas (Masson *et al.*, 1996a).

O estudo da evolução das aminas biogénicas e dos factores que condicionam a sua produção ao longo do processamento de enchidos, pode dar resposta a variadas questões tais como, a sua presença pode ser considerada como uma consequência natural dos processos de fermentação/maturação, ou surge como consequência de uma elaboração defeituosa, em condições tecnológicas impróprias, devido à má qualidade das matérias-primas ou a uma contaminação microbiana durante o processamento (Mariné-Font *et al.*, 1995).

1 - CLASSIFICAÇÃO DE ENCHIDOS

De acordo com a NP-588 de 1983 que define carnes preparadas, enchidos e ensacados, os enchidos de carne são produtos confeccionados com base em tecidos animais, fragmentados, picados ou em pasta, contidos e conservados em tripas ou em películas naturais ou sintéticas.

Com base na legislação portuguesa e na classificação efectuada por Rust (1994) estão representados na tabela 1.1 alguns dos diferentes enchidos que podemos encontrar no nosso país. Esta classificação é todavia arbitrária, já que, muitos dos produtos poderiam ser incluídos em várias classes dependendo de características específicas do seu processamento.

Os enchidos que estão representados na tabela 1.1 são apenas aqueles que vêm designados na legislação portuguesa, no entanto, existem muitos outros que, pela sua variedade e grande diversidade de região para região, não foram ainda caracterizados nem, por isso, contemplados na nossa legislação.

Tabela 1.1 - Classificação de enchidos (adaptado de Rust, 1994 e Normas Portuguesas)

Classificação	Características	Exemplos
Enchidos frescos	Carne e gordura de porco frescas, não curadas, picadas, condimentadas e geralmente enchidas em tripas; devem ser bem cozinhados antes do seu consumo.	Salsicha fresca (NP723:1989)
Enchidos secos curados	Carne e gordura de porco frescas, curadas, fragmentadas em dimensões variáveis, fermentadas ou não e dessecadas ao ar, podendo ser fumadas antes da dessecagem; servem-se geralmente frios.	Chouriço de carne (NP589:1987) Linguiça (NP590:1989)* Salpicão (NP591:1969)* Paio (NP592:1969)* ^a
Enchidos curados pelo fumo	Carne e gordura de porco ou de outras espécies, juntamente com outros ingredientes (vísceras, sangue, pão, farinha de trigo, etc.), condimentados, cozidos e fragmentados, enchidos em tripas e curados pelo fumo; devem ser cozinhados antes de servir.	Alheira (NP598:1969)* Chouriço mouro (NP595:1990) Farinheira (NP597:1983)
Enchidos curados por escaldão	Gordura de porco, sangue e/ou vísceras, frescas, condimentadas, finamente fragmentadas, enchidas em tripa e escaldadas, eventualmente fumadas; não requerem tratamento culinário posterior, mas por vezes aquecem-se antes de servir.	Chouriço de sangue (NP594:1990) Morcela (NP593:1990) Cacholeira (NP596:1990)*
Enchidos cozidos	Carne e gordura de porco, vaca ou aves e eventualmente estômago e couratos de porco, féculas e proteínas não cárneas, finamente picados de modo a formar uma massa fina e homogénea, condimentada, enchida em tripa e completamente cozida, podendo ser eventualmente fumada; não requerem tratamento culinário posterior, servindo-se frios.	Salsicha tipo "Frankfort"(NP724:1979) Mortadela (NP720:1983) Salame (NP719:1969) ^b

* Enchidos tradicionais portugueses. ^a Designado como ensacado de carne (NP588:1983). ^b Pode não ser cozido, mas apenas curado pelo ar.

2 – PROCESSO DE FABRICO DE ENCHIDOS SECOS CURADOS

Os enchidos conservados crus começaram por ser produzidos na China há 2500 anos. As primeiras referências a estes produtos na Europa são de há apenas 260 anos em Itália (Leistner, 1992; Rodel *et al.*, 1993; Kottke *et al.*, 1996). Desde então, cada país adoptou tecnologias próprias de fabrico. A formulação das carnes, o tipo de fragmentação, o tipo de especiarias utilizadas, a intensidade do sabor a fumo, a temperatura de acabamento e o tipo de tripa usado são variáveis que contribuem para a vasta gama de enchidos secos curados disponíveis no mercado (Rust, 1994).

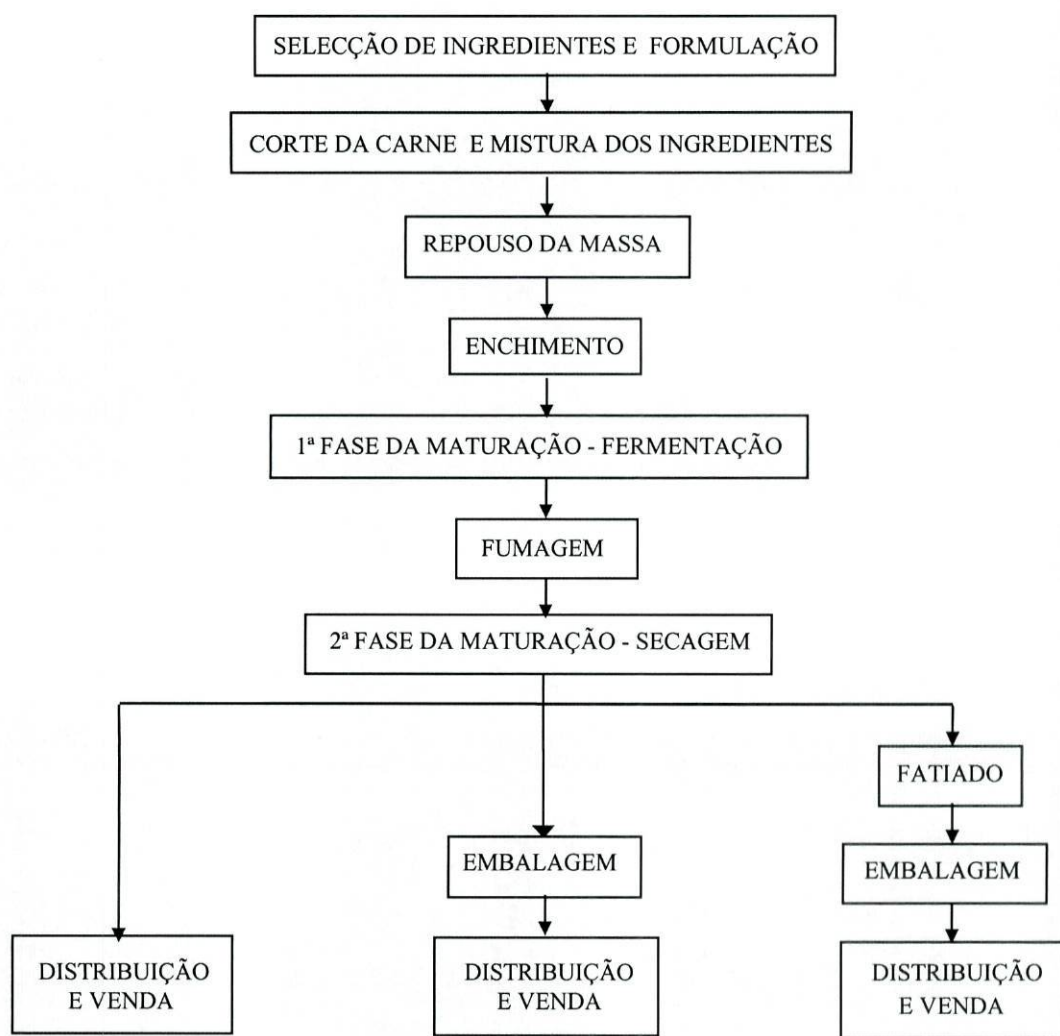
De acordo com Leistner (1992) e Marchesini *et al.* (1992), um enchido seco curado consiste em carne e gordura cruas subtilmente cortadas, as quais são misturadas com sal, especiarias e alguns aditivos; colocadas em tripas; e mantidas a uma temperatura e humidade relativa apropriadas; fermentadas e secas durante um período de tempo suficiente; o produto final é usualmente armazenado sem recurso à refrigeração e consumido sem necessitar de aquecimento.

Geralmente, este tipo de enchido torna-se estável e seguro devido a vários factores, nomeadamente, presença de nitritos, de flora competitiva e de baixos valores de pH e de actividade da água (a_w). Estes factores inibem as alterações indesejáveis assim como a acção de microrganismos responsáveis por toxinfecções; mas simultaneamente não afectam o desenvolvimento dos microrganismos desejáveis, em especial as bactérias lácticas.

A figura 1.1 apresenta um diagrama do processo de elaboração de enchidos secos curados. As diferenças e as excepções a este esquema são escassas, se bem que existam amplas variações nas condições tecnológicas adoptadas para levar a cabo estas etapas.

A única fase que se pode considerar opcional no esquema básico é a fumagem, podendo também ser realizada uma estufagem para promover a fermentação (Roncales, 1995).

Figura 1.1 - Diagrama do processo de elaboração de enchidos secos curados (adaptado de Roncales, 1995).



2.1 - SELECÇÃO DOS INGREDIENTES E FORMULAÇÃO

De uma maneira geral, o produto final é fortemente influenciado pela qualidade da matéria-prima, e por isso, os cuidados a ter no fabrico de um enchido devem começar logo na sua obtenção, selecção e tratamento (Halliday, 1969; Lago, 1997). Assim, partindo de uma matéria-prima de porco de raça ou de características determinadas, sendo conhecida a sua aptidão para a transformação, obedecendo aos critérios de peso e/ou idade ao abate e respeitando as condições de acabamento alimentar, podem-se produzir enchidos de elevada qualidade. As demais matérias-primas, embora secundárias em termos da quantidade em que são empregues, devem ser adicionadas de acordo com as receitas originais, nomeadamente a condimentação (Patarata *et al.*, 1998).

Carne

Apesar da importância da carne como matéria-prima predominante nestes produtos, a sua qualidade não determina por si só a qualidade do enchido final. Assim, com uma correcta formulação e um processo adequado, quase toda a carne pode ser transformada num enchido de qualidade (Roncales, 1995).

Gordura

A gordura não é um componente secundário dos enchidos e a sua utilização não deve ser vista como um procedimento para reduzir os custos de fabricação. Muito pelo contrário, a gordura confere aos enchidos curados determinadas características e/ou desempenha funções que influenciam de forma muito positiva a sua qualidade sensorial (Roncales, 1995).

Apesar disto, a gordura pode sofrer alterações negativas relacionadas fundamentalmente com fenómenos de oxidação, responsáveis pelo desenvolvimento de características indesejáveis ao nível do odor, sabor e cor (Pezacki, 1980).

Condimentos e especiarias

A adição de determinados condimentos e especiarias constitui uma das características que mais distingue os enchidos entre si (Roncales, 1995).

Como referido por Goutefongea (1991) e Lago (1997), o sal é o condimento mais antigo que se conhece e desempenha numerosas funções. Entre elas citam-se: conservante, promotor do sabor e agente solubilizante das proteínas, intervindo em processos bioquímicos que ocorrem durante a maturação do enchido. A quantidade de sal utilizada varia com a origem geográfica do enchido, com a necessidade de um tratamento térmico posterior e com o critério do fabricante. Os enchidos curados contêm geralmente 3 a 5% de sal, expresso em cloreto de sódio (Rust, 1994). Devido à relação existente entre o consumo de sódio e a hipertensão, os seus níveis tendem a diminuir e mais recentemente tem sido preconizada a sua substituição por potássio (Gou *et al.*, 1996).

Apesar da sua contribuição para o êxito na elaboração de enchidos, o sal é simultaneamente um elemento indesejável. Favorece a rancificação da gordura, diminuindo assim o tempo de armazenamento do produto, quer por congelação ou refrigeração, quer em produtos curados ou não curados. Tal deve-se à presença de impurezas no sal, nomeadamente metais pesados que têm um efeito pró-oxidante (Rust, 1994).

Condimentos como o alho e o pimentão conferem ao enchido não só cor e sabor, mas também, um certo potencial antioxidante. Esta característica, pouco conhecida até agora, é de

grande utilidade para a melhor conservação e estabilidade química dos enchidos fabricados com estes condimentos (Leistner, 1992).

No entanto, à semelhança dos restantes ingredientes, os condimentos e especiarias também podem afectar de forma negativa a composição e o processamento dos enchidos. Suportam uma carga microbiana que, adicionada à massa cárnea, pode modificar o desenrolar das transformações microbiológicas esperadas para o produto (Lago, 1997). Podem também conter moléculas e substâncias que condicionam tanto a composição como o processo de elaboração (Frey, 1983).

Aditivos e culturas iniciadoras (starters)

Dos aditivos químicos permitidos nos enchidos secos curados podemos destacar, devido à sua importância tecnológica, os açúcares, os antioxidantes, os fosfatos e por último, mas tão ou mais importantes, os agentes de cura.

Os diferentes açúcares incorporados diferem na composição química, no seu mecanismo de acção e na maneira como são utilizados pelos microrganismos. Podem ser adicionados glucose, lactose, dextrose e dextrinas (Leistner, 1992). A incorporação de uns ou de outros, permite seleccionar a flora microbiana, já que, nem todos são utilizados por todas as espécies microbianas presentes nos enchidos (Lago, 1997). Independentemente do açúcar escolhido, e como referido por Townsend e Olson (1994) e Rust (1994), este é um ingrediente fundamental dos enchidos crus secos, pois proporciona a fonte de energia às bactérias ácido-lácticas essenciais à fermentação. São utilizados em teores da ordem de 0,5 a 2%, dependendo do sabor ou do pH final desejado.

Os antioxidantes são um grupo de compostos que retardam o ranço da gordura que, como foi referido anteriormente, é responsável por alterações na cor, sabor e aroma dos enchidos. A oxidação da gordura é um processo de autooxidação em que os produtos iniciais da reacção (radicais livres) catalisam a própria reacção. Os agentes antioxidantes reagem com estes produtos iniciais e previnem as reacções posteriores (Rust, 1994). Para além desta função, os antioxidantes, como por exemplo o ácido ascórbico e o ascorbato de sódio, funcionam como redutores relativamente fortes. Intervêm directamente no processo de desenvolvimento e estabilização da cor de cura dos produtos, pois contribuem para a passagem de nitrito a óxido nítrico, como se verá mais adiante (Frey, 1983).

Os fosfatos, por sua vez, permitem aumentar o rendimento dos produtos por aumentarem a capacidade de retenção de água dos mesmos. Apesar de se pretender que durante o período de dessecação ocorra uma redução da quantidade de água, é importante reter parte desta para melhorar as características de textura do produto, nomeadamente a sua suculência (Whiting,

1988). Para além desta função, criam um sistema tampão que pode evitar acidificações elevadas. Utilizam-se misturas de mono, di e polifosfatos em função do pH final que se pretende (Lago, 1997). Nos enchidos secos curados, a legislação comunitária admite um teor máximo de fosfatos de 0,5% no produto final, expressos em pentóxido de fósforo (Decreto-Lei 363/98).

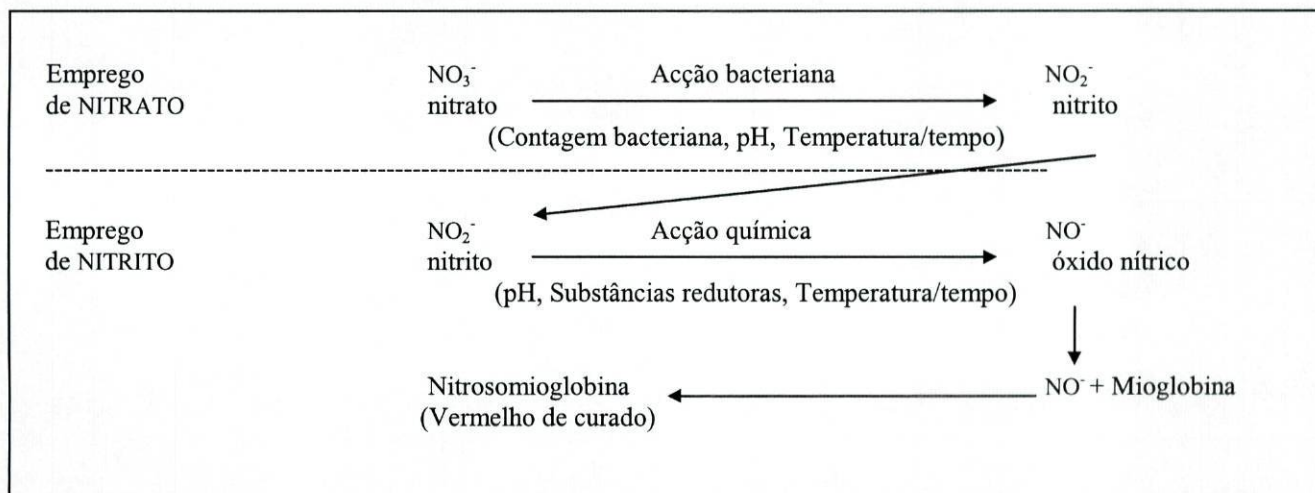
De entre todos os aditivos químicos, os agentes de cura são aqueles cuja aplicação é mais controversa. O nitrato e o nitrito sempre estiveram presentes nos produtos, pois são veiculados indirectamente através do sal, alho e pimentão, entre outros (Patarata *et al.*, 1998).

A legislação vigente nos países da comunidade europeia limita os teores de nitrato e nitrito a utilizar durante o processamento e presentes no produto acabado. Essas restrições justificam-se pelo risco de toxicidade que estes aditivos representam para o consumidor, quando ingeridos em quantidades relativamente elevadas, e ainda, pelo potencial risco de formação, tanto ao nível endógeno como exógeno, de compostos químicos considerados cancerígenos - as nitrosaminas. No entanto, funcionam como uma garantia adicional para a saúde do consumidor, nomeadamente por contribuírem para a inibição de alguns microrganismos particularmente perigosos para o Homem, dos quais se destaca o *Clostridium botulinum* (Freitas *et al.*, 1992; Townsend e Olson, 1994).

Para além da sua acção conservante, o nitrato e o nitrito contribuem para o desenvolvimento e a estabilização da cor e do aroma típico dos produtos curados. Exibem ainda propriedades antioxidantes (Vignolo *et al.*, 1988; Wirth, 1992; Lortzing, 1996; Schiffner *et al.*, 1996a). A partir do nitrato, por sucessivas reduções, forma-se o óxido nítrico que, por reacção com a mioglobina, forma a nitrosomioglobina, pigmento vermelho do produto curado (Lago, 1997). De acordo com Chasco *et al.*, (1996) este é um processo lento e complexo, resultando numa série de reacções microbianas, enzimáticas e químicas, por sua vez dependentes de vários factores (pH, concentração do pigmento, potencial redox, distribuição dos agentes de cura, temperatura, humidade, etc.). As reacções que ocorrem, não sendo conhecidas na totalidade, estão representadas de forma simplificada na figura 1.2.

Na formulação podem ser incorporados nitratos, nitritos ou uma mistura de ambos. Assim, de acordo com o Decreto-Lei 363/98, pode utilizar-se o nitrato de sódio ou potássio em níveis residuais inferiores a 250 mg/kg (expressos em NaNO_3) em todos os enchidos curados. Os nitritos de sódio ou potássio empregam-se em enchidos secos curados em valores residuais máximos de 50 mg/kg (expressos em NaNO_2).

Figura 1.2 - Mecanismo de reacção (simplificado) da formação da cor de curado em enchidos (adaptado de Wirth, 1992).



Usam-se frequentemente aceleradores do curado como o ascorbato e o isoascorbato de sódio. A sua função é aumentar a velocidade de desenvolvimento da cor de cura durante os processos de estufagem e fumagem. Empregam-se em teores aproximados de 54,5g por cada 100kg de carne. Utilizam-se também, em determinadas situações, o pirofosfato de sódio e a glucono- δ -lactona (GDL) em concentrações da ordem de 500g por 100kg de carne. Estes dois produtos reduzem o pH da carne em 0,2 a 0,3 unidades. A utilização de GDL é permitida em enchidos secos curados até 1%, reduzindo o pH em 0,5 unidades. Por influência da água contida na carne, a GDL hidroliza-se formando ácido glucónico, o que leva à descida do pH (Rust, 1994; Bohme *et al.*, 1996). Esta reacção depende da quantidade de GDL adicionada e da temperatura a que ocorre (Coretti, 1971; Frey, 1983). A GDL é muitas vezes adicionada em substituição das culturas iniciadoras porque baixa o pH mais rapidamente, suprimindo os microrganismos responsáveis pela deterioração, estabiliza a cor de cura e simplifica a produção (Buncic *et al.*, 1993).

As culturas iniciadoras têm sido alvo de vários estudos que levaram à sua utilização na produção de vários produtos cárneos secos curados, nomeadamente enchidos. No fabrico destes produtos os microrganismos desempenham um papel decisivo: na redução dos nitratos a nitritos, na descida do pH, no desenvolvimento do aroma, na estabilidade da cor e na capacidade de conservação (Hugas e Monfort, 1997).

Desde o início dos anos 60 que estão disponíveis no mercado várias combinações de bactérias lácticas e *Micrococcaceae* para utilização na produção de enchidos (Hugas *et al.*, 1992; Talon *et al.*, 1992; Mares *et al.*, 1994). Em Portugal ainda não se incorporam culturas iniciadoras no fabrico de enchidos secos curados, no entanto, no resto da Europa empregam-se com frequência misturas de lactobacilos/pediococos (bactérias lácticas) e micrococos/estafilococos

(*Micrococcaceae*), enquanto que nos EUA são principalmente os lactobacilos ou pediococos, como bactérias lácticas, que são utilizados (Borpuzari e Boschkova, 1993).

Podem ainda ser utilizadas estirpes de fungos que cresçam bem no substrato enchido seco, possuam as propriedades tecnológicas requeridas e sejam toxicologicamente inofensivas (Geisen *et al.*, 1992). Normalmente, a microflora natural é dominada por espécies de *Penicilium* mas também se podem encontrar espécies de *Aspergillus* (Andersen, 1992).

Embora, e como já foi dito, seja cada vez mais frequente a utilização de culturas iniciadoras na produção de enchidos secos curados, é possível produzi-los de forma excelente sem recorrer à sua utilização. Isto porque, não sendo possível a esterilização do substrato do ponto de vista tecnológico, a microflora inicial que prevalece pode fermentar o substrato. Por esta razão, nos produtos cárneos, a cultura iniciadora não é a única responsável pelos processos que ocorrem, actuando em conjunto com outros factores para a optimização do produto final (Ramón *et al.*, 1992).

Assim, se as condições de maturação forem mantidas, Leistner (1992) afirma que a microflora tecnologicamente benéfica, que ocorre naturalmente na carne crua, tem uma vantagem selectiva e permite a preservação necessária, influenciando significativamente as características organolépticas (aparência, cheiro, sabor, textura) do enchido. No entanto, de acordo com Sharma e Mukhopadhyay (1992), a produção de enchidos sem a introdução de culturas iniciadoras, falha por falta de uniformidade na qualidade final do produto, ocorrendo frequentemente uma deterioração precoce deste.

A tabela 1.2 resume a influência que podem ter, ao nível das características dos enchidos secos curados, alguns dos aditivos referidos e das culturas iniciadoras.

Tabela 1.2 - Eficiência dos aditivos na produção de enchidos secos curados (adaptado de Frey, 1983). + = influência escassa; ++ = influência acentuada

	Desenvolvimento de cor	Estabilidade da cor	Consistência	Resistência ao corte	Sabor	Aroma	Capacidade conservação
Sal				+	++		+
Nitrato/ nitrito	++	++			+		+
GDL	+	+	+	++	+	++	+
Açúcares	+	+	+	++	+	++	+
Ác.ascórbico/ ascorbato	++	++					+
Cultura iniciadora	++	++	++	++	++	++	++

* Com quantidades elevadas de GDL pode acentuar-se a tendência para a rancificação, essencialmente se este processo já se iniciou.

2.2 - CORTE DAS CARNES

O corte das carnes ou miga é uma operação que tem por fim reduzir a carne e a gordura a fragmentos pequenos, cujo volume está em estreita relação com o tipo de enchido (Janeiro, 1948; Klettner e Baumgartner, 1980). O corte das carnes era originalmente realizado à mão, mas actualmente existem equipamentos que realizam esta operação. A utilização deste tipo de equipamentos reduz a manipulação do produto, o que, aliado à utilização de carnes refrigeradas ou congeladas, tem uma acção positiva na redução da contaminação microbiológica (Leistner, 1992; Patarata *et al.*, 1998). Do ponto de vista físico, produz-se um aumento da superfície, o que facilita a extracção da água durante a fase de secagem e a extracção de proteínas hidrossolúveis responsáveis, juntamente com outras substâncias, pela ligação do produto (Lago, 1997).

2.3 - MISTURA E REPOUSO DA MASSA

De acordo com Schiffner *et al.* (1996b), a correcta mistura da massa é muito importante, não só para que a carne, a gordura e os condimentos se repartam uniformemente, mas também para se conseguir uma estrutura adequada.

A mistura das matérias-primas com os condimentos, pode ser realizada manualmente ou, mais recentemente, recorrendo a máquinas apropriadas para o efeito, permitindo assim obter homogeneizações eventualmente melhores, e mais uma vez, reduzindo os riscos de contaminação.

O repouso da massa, a chamada fase de tempero, tem uma duração variável de acordo nomeadamente com o tipo de produto e a região de produção. Originalmente, como os enchidos eram (e ainda são tradicionalmente) produzidos nos meses de Inverno, em regiões do interior e/ou de montanha, a temperatura baixa necessária nesta fase era assegurada pelas condições climáticas do meio e pelas condições precárias das habitações onde era realizado o fumeiro. Actualmente, para produzir este tipo de produtos com garantia de qualidade, nomeadamente sanitária, e para poder ultrapassar a sazonalidade da produção, incomportável pelo sector empresarial, é absolutamente necessário recorrer à refrigeração. Estando as matérias-primas naturalmente contaminadas com microrganismos potencialmente perigosos para o consumidor, só com este procedimento se consegue deter o desenvolvimento microbiano nas massas em tempero, as quais apresentam condições muito favoráveis para o efeito (a_w elevada, valores de pH próximos do óptimo de desenvolvimento microbiano, elevada disponibilidade de factores nutritivos) (Patarata *et al.*, 1998).

2.4 - ENCHIMENTO

Esta operação consiste em introduzir a massa no invólucro que lhe é destinado (Janeiro, 1948; Klettner e Baumgartner, 1980; Lago, 1997). Este invólucro é uma tripa apropriadamente escolhida, que pode ser, tradicionalmente, de origem animal, mas também de colagénio ou celulose, dependendo das características do enchido e das condições tecnológicas (Roncales *et al.*, 1989; Leistner, 1992). A tripa deve estar sã e íntegra, para poder suportar as pressões necessárias à obtenção de um enchimento perfeito, e ainda, ser permeável à humidade e ao fumo, e ter a capacidade de se ligar à superfície da carne, de modo a não se desprender enquanto o enchido desseca e contrai (Schiffner *et al.*, 1996b).

De acordo com Patarata *et al.* (1998), o enchimento pode ser feito manualmente mas, a operação de enchimento mecânico, para além de mais rápida e menos penosa para os operários, promove uma redução da manipulação, desejável como já foi referido, e reduz a probabilidade de ocorrência de bolsas de ar, responsáveis por defeitos de fabrico (desenvolvimento microbiano, fenómenos de oxidação lipídica e dos pigmentos, com ocorrência de aromas e colorações desagradáveis).

2.5 - FERMENTAÇÃO - 1ª FASE DA MATURAÇÃO

De acordo com Schiffner *et al.* (1996b) e Lago (1997), o conceito de maturação compreende diferentes processos que têm lugar após elaboração da massa do enchido. Estes processos são responsáveis pelas características típicas dos distintos tipos de enchidos.

A maturação desenvolve-se em 2 fases. Na primeira fase predominam as actividades proliferativas e metabólicas das bactérias. Esta fase termina com a diferenciação bacteriana e caracteriza-se pelo aparecimento de ácidos, fundamentalmente ácido láctico e ácido pirúvico, resultantes do metabolismo dos referidos microrganismos (Lago, 1997).

O processo de fermentação é o mais estudado de todos os que se verificam ao longo do complexo sistema de modificações que dão lugar aos enchidos secos curados. Como foi referido anteriormente, a acidificação ocorre essencialmente pela formação de ácido láctico, a partir dos açúcares presentes na massa, metabolizados por bactérias lácticas (Bello e Sanchez-Fuertes, 1997). Estes microrganismos, pertencentes a diversas espécies dos géneros *Lactobacillus* e/ou *Pediococcus*, podem colonizar de maneira espontânea a massa ou ser adicionados como “starters” (culturas iniciadoras). Em ambos os casos, estão descritos valores muito elevados de microrganismos (até cerca de 10^8 UFC/g) nos primeiros dias do processo (Girard e Bucharles, 1991; Niven, 1994).

Como consequência, verifica-se uma descida do pH, o qual estabiliza depois de um período mais ou menos rápido de diminuição. Os seus valores oscilam entre 4,5 e 5,5, sendo mais frequentes os pH próximos de 5,5.

O pH ácido exerce uma série de efeitos claramente benéficos para o próprio processo de elaboração dos enchidos, assim como para a sua qualidade e capacidade de conservação. Entre esses efeitos, citam-se os seguintes (Leistner, 1992 e Roncales, 1995):

- Contribui para a conservação do enchido, ao exercer um forte efeito inibidor do crescimento da maioria dos microrganismos não desejáveis.
- Potencia o processo de maturação, pois favorece, no caso de não ser excessivamente baixo, o crescimento de bactérias da família *Micrococcaceae*. Estas são, em grande parte, responsáveis pela produção de nitrato- e nitrito-redutases, e pelos mecanismos maturativos de proteólise e lipólise. Como alguns destes microrganismos são produtores de catalase, evitam desta forma a descoloração dos enchidos, que pode ocorrer devido à oxidação do pigmento da carne pelo peróxido de hidrogénio, produzido pelas bactérias lácticas (Petäjä e Puolanne, 1993; Zaniboni *et al.*, 1995).
- Favorece a formação desejada da cor típica dos produtos curados, ao activar a síntese de nitrosomioglobina, já que, num meio ácido há uma maior produção de óxido nítrico a partir do nitrito que poderá reagir com a mioglobina.
- Aumenta a velocidade de dessecação, já que diminui a capacidade de retenção de água das proteínas cárneas. O ponto isoeléctrico das proteínas miofibrilhares é de cerca de 5,5; nestas condições de pH ácido a repulsão entre as proteínas é mínima pelo que tendem a aproximar-se, expulsando a água que ocupava esse espaço.
- Acelera o mecanismo de gelificação das proteínas miofibrilhares, o que tem como consequência um aumento da intensidade da ligação da massa.
- Activa as enzimas proteolíticas e lipolíticas lisossomais, que contribuem para o processo de maturação.

Por sua vez, a velocidade e intensidade de diminuição do pH é determinada por um número elevado de factores, vários dos quais se encontram interrelacionados entre si. De acordo com Roncales (1995), estes factores são resumidamente os seguintes:

- Adição ou não de “starters”.

É evidente que, se em vez de se esperar o crescimento espontâneo da flora presente na massa, se adicionarem culturas microbianas seleccionadas, a acidificação será maior e mais rápida.

- Quantidade de açúcar.

A quantidade de açúcares da carne é muito pequena, pelo que a acidificação será escassa se não se adicionarem este tipo de compostos durante a formulação do enchido. Quanto maior for a quantidade de açúcar adicionado mais intensa será a descida do pH.

- Tipo de açúcar em relação ao tipo de “starter” adicionado.

É sabido que a maior parte dos *Lactobacillus* fermentam todos os açúcares, enquanto que os *Pediococcus* só fermentam a glucose. A velocidade de fermentação dos diversos açúcares também pode variar dentro das espécies de cada género.

- A temperatura das câmaras de estufagem na fase inicial do processo de elaboração.

Quanto mais alta for a temperatura e mais próxima de 22-25°C (temperatura óptima de crescimento das bactérias lácticas) maior será a velocidade de acidificação. Este facto é utilizado, na prática, ao levar a cabo a secagem em estufa mais ou menos intensa no início do processo. Se se usarem estufagens adequadas, bem como relações temperatura-tempo-humidade equilibradas, consegue-se uma acidificação desejável da massa do enchido. É preciso ter em conta, no entanto, que a não adição de “starters” ou de açúcares pode originar o crescimento incontrolado de microrganismos não desejáveis durante a estufagem.

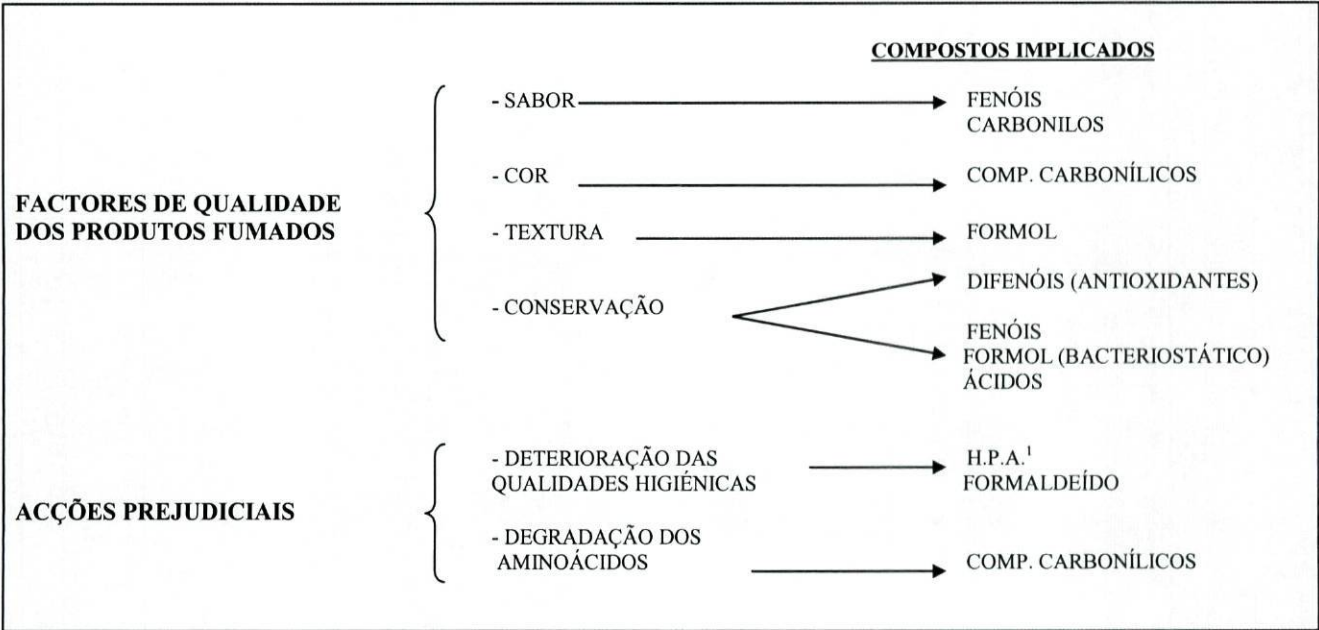
2.6 - FUMAGEM

A fumagem é, por definição, a operação que consiste essencialmente em submeter um produto alimentar à acção dos produtos gasosos que se desprendem durante a combustão de certos vegetais. Esta operação, tal como a maturação, é uma das fases mais importantes para a garantia de qualidade do produto, pelo que devem ser escrupulosamente respeitadas as condições preconizadas (Mateo e Zumalacárregui, 1996).

A fumagem, originalmente realizada na cozinha do produtor, pode ser conseguida em câmaras específicas para o efeito. A escolha adequada deste equipamento pode ser um dos factores mais importantes para o fabrico de produtos de qualidade, nomeadamente porque podem permitir um controlo muito rigoroso da temperatura e humidade relativa, parâmetros de controlo fundamentais nesta fase do processamento (Patarata *et al.*, 1998).

De acordo com Mateo e Zumalacárregui (1996), a acção do fumo nos enchidos traduz-se na sua qualidade gustativa (aroma e textura), na sua apresentação (coloração) e na sua conservação. O fumo é constituído por uma grande variedade de compostos voláteis, destacando-se os compostos fenólicos e carbonílicos como sendo os principais responsáveis pelos seus efeitos nos produtos. Na figura 1.3 estão esquematizadas as características veiculadas pelo fumo aos produtos e os compostos responsáveis.

Figura 1.3 - Compostos do fumo e características dos enchidos com as quais estes compostos estão relacionados (adaptado de Girard, 1991a).



1 – Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

2.7 - SECAGEM - 2ª FASE DA MATURAÇÃO

De acordo com Patarata *et al.*, (1998), a secagem, fase que ocorre a seguir à fumagem, deve ser realizada sob rigoroso controlo das condições ambientais (temperatura e humidade relativa) e do cumprimento dos períodos de tempo estabelecidos. É nesta fase do processo de maturação que ocorre a redução da a_w para valores compreendidos entre 0,85 e 0,95. Estes valores asseguram a conservação e segurança higio-sanitária dos produtos à temperatura ambiente, pois permitem uma lenta, mas constante diminuição do número de bactérias. Simultaneamente, verificam-se fenómenos bioquímicos de proteólise e lipólise, os quais determinam as características organolépticas de eleição, nomeadamente sápidas e aromáticas, que reconhecemos à salsicharia (Marchesini *et al.*, 1992; Kottke *et al.*, 1996). Uma decomposição proteica avançada conduz à formação de amoníaco, o qual provoca a elevação do pH, situação característica desta fase (Schiffner *et al.*, 1996b; Lago, 1997).

Depois do tratamento em câmara de cura, os enchidos são transferidos para câmaras de dessecação onde são mantidos durante um tempo variável, e dependente do tipo e do tamanho das peças. Durante a dessecação, estes enchidos perdem 30 a 40% do seu peso inicial. É de extrema importância que a perda de humidade seja gradual e uniforme. Se não o é, pode ocorrer a formação de buracos ou gretas, crosta ressequida e/ou desprendimento da tripa. A crosta ressequida pode impedir a saída de água do interior do enchido, provocando uma tenrura excessiva da massa nos produtos de maior calibre. A temperatura das câmaras de secagem varia entre 10 e 17°C, com uma humidade relativa de 65-85%, dependendo do tipo de enchido.

Também se controla o fluxo de ar para que decorra com características uniformes em torno de todo o enchido (Potthast, 1982; Girard, 1991b; Toldrá, 1992).

Durante a secagem, os fungos colonizam com frequência a superfície dos enchidos, sendo considerados meramente como um incómodo que afecta o aspecto exterior do produto e que se elimina através de uma escovagem superficial ou lavagem antes da comercialização (Rust, 1994). A legislação permite, no entanto, a aplicação de antifúngicos de superfície como o sorbato, o benzoato, o *p*-hidroxibenzoato e a natamicina.

2.8 - EMBALAGEM

De acordo com Ramsbottom (1978), as principais funções da embalagem para carne e produtos cárneos são a protecção do produto contra danos físicos, alterações químicas e contaminação microbiana, constituindo ainda uma forma de apresentação mais atractiva.

Assim, depois de assegurar o fabrico de um produto de qualidade, é necessário manter essa qualidade até ser consumido. Os produtores particulares sempre o fizeram, introduzindo o produto acabado em azeite, em cereal, ou como se tem observado recentemente, em frascos de vidro hermeticamente fechados.

Existe actualmente no mercado uma grande oferta de embalagens de vários tipos (sob vácuo, em atmosfera modificada) que podem contribuir para a manutenção da qualidade. A distribuição a granel, para além de ter efeitos negativos na rendibilidade, pois os produtos desidratam consideravelmente durante a distribuição e comercialização, pode ser responsável pela ocorrência de defeitos (desenvolvimento de bolores ou bactérias à superfície, oxidação de gorduras, entre outros).

A embalagem, como já foi referido, para além de ser um importante veículo para cativar o consumidor, pode ainda permitir a transmissão de informações que são legalmente obrigatórias (Patarata *et al.*, 1998).

3 – EVOLUÇÃO DAS AMINAS BIOGÉNICAS EM ENCHIDOS SECOS CURADOS

Ao longo do processamento de enchidos secos curados ocorrem condições favoráveis à formação de amins biogénicas uma vez que:

- i) a contagem de microrganismos pode ser alta;
- ii) o processo de fabrico é lento, permitindo um certo grau de proteólise e consequente libertação de aminoácidos livres;
- iii) o pH baixo dos produtos pode favorecer a descarboxilação dos aminoácidos (Buncic *et al.*, 1993; Hernández-Jover *et al.*, 1997a).

O conhecimento dos teores de amins biogénicas presentes nos enchidos é importante porque: - estas contribuem para o sabor e odor característicos destes produtos, - são precursoras de certas substâncias aromáticas desagradáveis; - do ponto de vista sanitário, quando em quantidade excessiva, podem constituir um problema para a saúde do consumidor (Demeyer, 1992).

3.1 - ORIGEM DAS AMINAS BIOGÉNICAS

As amins são bases orgânicas de baixo peso molecular formadas em organismos vivos em consequência dos seus processos metabólicos (Luten e Bouquet, 1992 citados por Mariné-Font *et al.*, 1995). Nesta ampla definição podem-se agrupar compostos com diferentes estruturas químicas, tendo como pontos comuns um grupo amina e uma origem biológica (Bover-Cid *et al.*, 2000). Estes compostos podem ser classificados pelo número de átomos de hidrogénio substituídos no átomo de azoto, como amins primárias, secundárias ou terciárias, ou pelo número de grupos amina, em mono-, di-, e poliaminas (Halász e Baráth, 1998). As amins podem ainda ser classificadas, segundo a sua estrutura química, da seguinte forma (Izquierdo-Pulido, 1991 citado por Mariné-Font *et al.*, 1995):

- a) amins aromáticas (histamina, tiramina, serotonina, triptamina e β -feniletilamina).
- b) diaminas alifáticas (putrescina e cadaverina).
- c) poliaminas alifáticas (agmatina, espermina e espermidina).

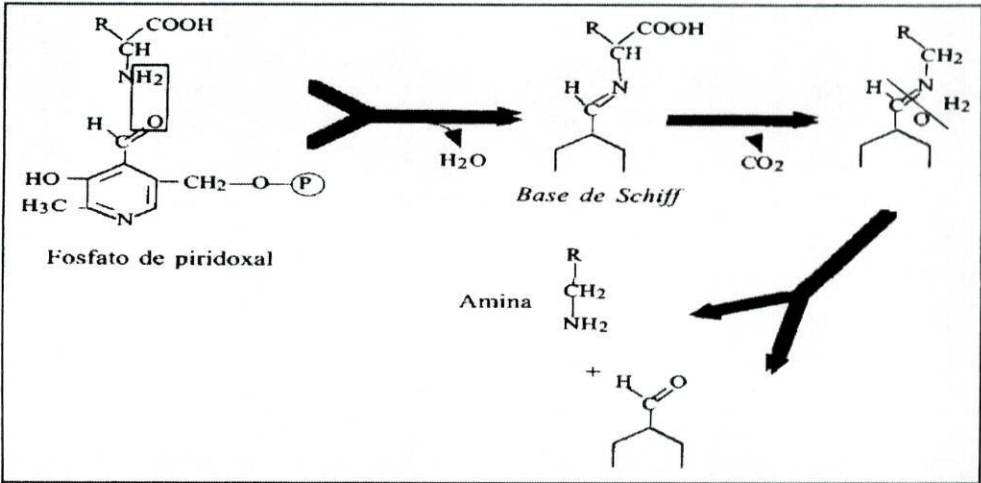
As amins podem ser voláteis (tabela 1.3) ou não voláteis (Masson, 1998). Estas últimas têm características e funções biológicas muito diversas, sendo classificadas como poliaminas naturais ou amins biogénicas. As poliaminas naturais têm origem endógena e estão presentes nos alimentos em concentrações não tóxicas sendo essenciais para diversos organismos vivos. As amins biogénicas, sendo produzidas por acção microbiana, são maioritariamente prejudiciais (Bardocz, 1999).

Tabela 1.3 – Aminas voláteis formadas por aminação de aldeídos (Maga, 1978 citado por Masson, 1998).

AMINOÁCIDOS PERCURSORES	ALDEÍDOS PERCURSORES	AMINAS VOLÁTEIS
Norleucina	Valeraldeído	Amilamina
Leucina	Isovaleraldeído	Isoamilamina
Isoleucina	2-metilbutanal	2-metilbutilamina
Norvalina	Butiraldeído	Butilamina
Valina	Isobutiraldeído	Isobutilamina
Alanina	Acetaldeído	Etilamina

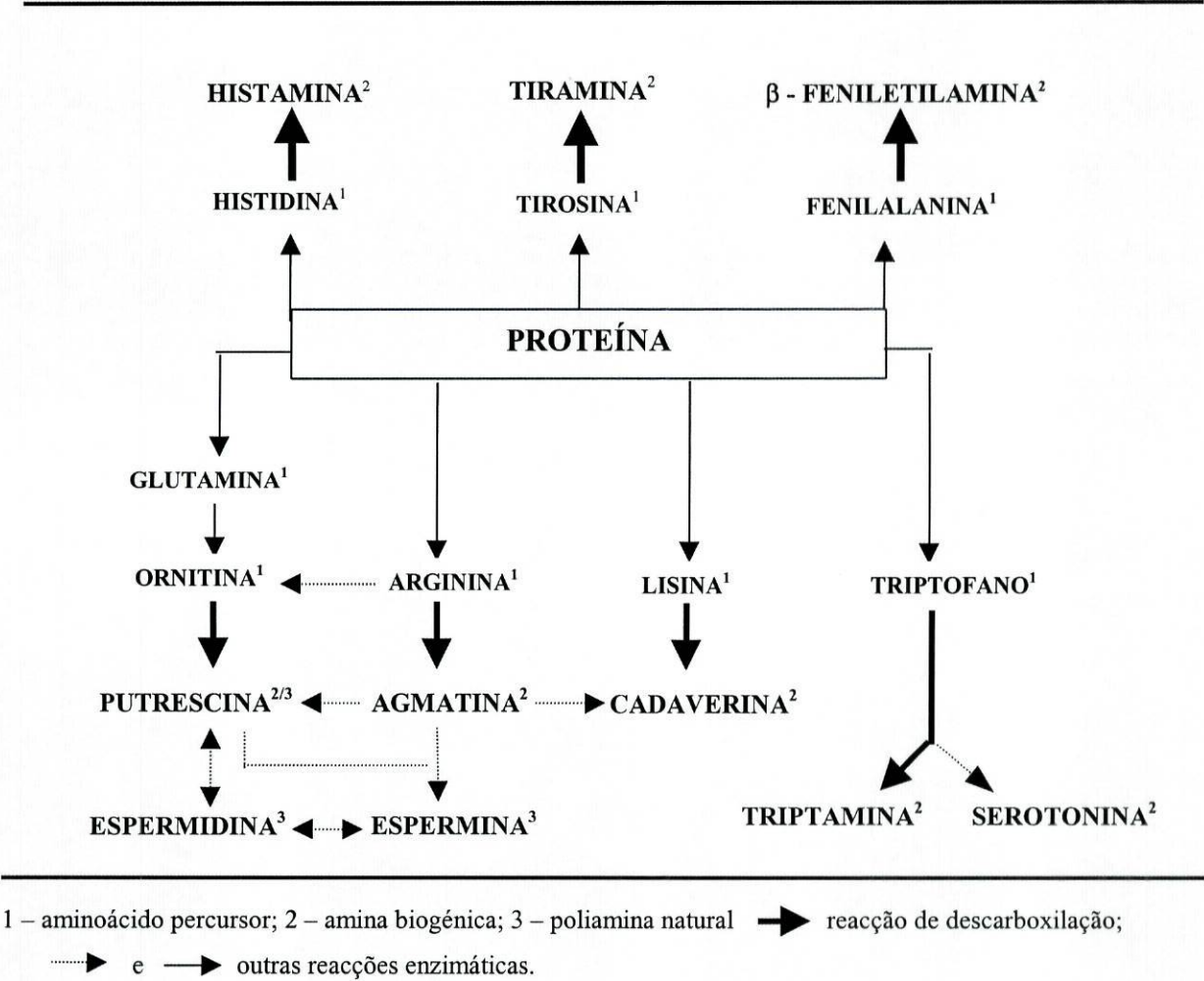
Não é possível estabelecer um mecanismo de formação comum para todas as aminas biogénicas presentes em alimentos, resultando maioritariamente da acção de descarboxilases de origem microbiana sobre aminoácidos (Maijala, 1993; Bockhardt *et al.*, 1996; Shalaby *et al.*, 1996; Veciana-Nogués *et al.*, 1997; Roig-Sagués *et al.*, 1997; Paulsen *et al.*, 1997; Simon-Sarkadi, 2000). Podem também resultar da hidrólise de outros produtos azotados, ou da aminação ou transaminação de aldeídos e cetonas (Askar e Treptow, 1986 citados por Maijala *et al.*, 1993a). De acordo com Maijala (1994a), as descarboxilases são geralmente específicas para um aminoácido e particularmente para a forma L. A descarboxilação de aminoácidos produz dióxido de carbono e dá origem a uma amina primária (RNH₂), cuja fórmula pode ser facilmente deduzida a partir do aminoácido descarboxilado (figura 1.4). Esta via enzimática dá lugar sobretudo à formação de poliaminas, no entanto também se produzem desta forma algumas monoaminas (Diaz *et al.*, 1995).

Figura 1.4 – Mecanismo possível de descarboxilação de aminoácidos (adaptado de Campos, 1998).



A figura 1.5 mostra um esquema dos circuitos de formação das amins biogénicas e poliaminas naturais mais comuns em produtos cárneos.

Figura 1.5 – Vias de formação das amins biogénicas, poliaminas naturais e seus precursores (adaptado de Mariné-Fonte *et al.*, 1995).



3.2 - Toxicidade das amins biogénicas

As amins biogénicas em alimentos não representam, normalmente, um risco para a saúde dos indivíduos, a não ser que sejam ingeridas grandes quantidades, ou que os mecanismos naturais para o catabolismo de uma ou mais amins sejam inibidos ou estejam geneticamente deficientes (Simon-Sarkadi e Hodosi, 1998; Halász *et al.*, 1994). Estes compostos podem assim provocar efeitos diversos no organismo, os quais são influenciados por diversos factores nomeadamente (Vidal-Carou, 1989 citado por Calhau *et al.*, 1999; Treviño *et al.*, 1997b):

- (i) quantidade ingerida
- (ii) associação a inibidores das mono e diaminoxidases

- (iii) ingestão de álcool
- (iv) presença de outras amins não voláteis
- (v) doenças gastrointestinais

Algumas amins biogénicas como a histamina, a tiramina, a triptamina e a β -feniletilamina, têm propriedades vasoactivas que, quando associadas a uma ou mais das condições anteriores, tornam a sua presença em alimentos num perigo para a saúde pública. Por sua vez, a putrescina, a cadaverina, e as poliaminas naturais espermina e espermidina não têm efeitos adversos para a saúde, no entanto, potenciam a toxicidade da histamina e da tiramina ao inibirem a actividade das enzimas de destoxicação – aminoxidases (Hernandez-Jover *et al.*, 1997a; Ayhan *et al.*, 1999; Eerola e Maijala, 1999; Bover-Cid *et al.*, 2000). A espermidina, a espermina e a putrescina desempenham papéis importantes ao nível do metabolismo celular, actuando como estimulantes do crescimento das células, tecidos e órgãos (Kalac *et al.*, 1999).

A tabela 1.4 apresenta alguns riscos toxicológicos associados ao consumo de alimentos com teores elevados de amins biogénicas e poliaminas naturais.

Tabela 1.4 – Efeitos indesejáveis associados ao consumo de alimentos com elevados teores de amins biogénicas e poliaminas naturais (adaptado de Mariné-Font *et al.*, 1995).

	Intoxicação histamínica	Enxaqueca	Interacção IMAO	Formação nitrosaminas	Outros efeitos
Histamina	+++	++	+++	+	Toxicidade hepática
Tiramina	+	+++	+++	+	Neurológicos / Cardíacos
β -Feniletilamina	+	++	+++	+	Neurológicos
Serotonina	-	-	+++	+	Gástricos / Cardíacos
Triptamina	+	-	+	+	Cardíacos
Putrescina	+	-	-	+	-
Cadaverina	+	-	-	+	-
Espermidina	+	-	-	+	-
Espermina	+	-	-	+	-
Agmatina	-	-	-	+	-

IMAO – inibidor das mono-aminoxidases

A intoxicação histamínica resulta da decomposição microbiana dos alimentos, os quais nas etapas iniciais, não apresentam características organolépticas desagradáveis. Os níveis de histamina considerados tóxicos são muito variáveis, podendo ir de 5mg/100g de produto, para indivíduos especialmente sensíveis ou tratados com medicamentos inibidores da enzima monoaminoxidase (IMAO), até 50mg/100g de produto (Mariné-Font *et al.*, 1995).

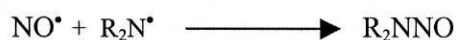
Os sintomas desta intoxicação são cutâneos, gastrointestinais, circulatórios e neurológicos e são tratados com anti-histamínicos.

Os medicamentos IMAO têm a capacidade de bloquear a desaminação oxidativa das aminas biogénicas endógenas e das exógenas veiculadas pelos alimentos, o que dificulta a destoxicação destes compostos (Jarisch, 2000).

Tem sido investigada a possível acção precursora de mutagenicidade por aminas, já que estas podem ser nitrosadas ou actuar como precursoras de outros compostos capazes de formar nitrosaminas, as quais são carcinogénicas para várias espécies de animais e constituem um potencial risco para a saúde humana (Mariné-Font *et al.*, 1995).

As nitrosaminas formam-se quando um grupo nitroso (-N=O), geralmente proveniente do ácido nitroso (H-O-N=O), se liga a um átomo de azoto de certos compostos nitrogenados (Townsend e Olson, 1994).

De acordo com Frouin *et al.* (1981) a reacção entre um grupo nitroso e uma amina, responsável pela formação de nitrosaminas, ocorre da seguinte forma:



Qualquer ingrediente que contenha aminas secundárias (R_2NH) como agmatina, espermina e espermidina, ou terciárias (R_3N), pode reagir com os nitritos para formar nitrosaminas (Binstok *et al.*, 1996). A reacção de agentes nitrosos com aminas primárias produz espécies “alcalinizantes” de vida curta, que reagem com outros componentes da matriz dos alimentos para gerar produtos (principalmente álcoois) isentos de actividade tóxica, mesmo em concentrações relevantes (Ahmad *et al.*, 1987 citados por Santos, 1996). No entanto, as aminas primárias como a cadaverina e a putrescina, podem converter-se em aminas secundárias, não só pela acção do calor, mas também à temperatura ambiente durante a maturação e armazenamento dos enchidos (Eerola *et al.*, 1997). Podem sofrer nitrosação posterior e originar então compostos N-nitroso lábeis (Pfundstein *et al.*, 1991 citados por Santos, 1996). Assim, a putrescina e a cadaverina são convertidas em pirrolidina e piperidina, respectivamente, a partir das quais se formam a N-nitrosopirrolidina (NPYR) e N-nitrosopiperidina (NPIP) (Doyle *et al.*, 1993 citados por Shalaby, 1996). Estas últimas, juntamente com a N-nitrosodimetilamina (NDMA) e N-

nitrosodietilamina (NDEA), formadas a partir da dimetilamina e da dietilamina, respectivamente, são algumas das nitrosaminas voláteis que se têm detectado em produtos cárneos curados com adição de nitrito, como é o caso dos enchidos secos curados (Lakritz *et al.*, 1976; Eerola *et al.*, 1997; Eerola *et al.*, 1998).

As nitrosaminas podem formar-se directamente nestes produtos, no entanto, a probabilidade de formação é fraca, já que, uma grande parte dos nitritos são convertidos em iões nitroso que se fixam preferencialmente aos pigmentos da carne, desempenhando assim um papel antinitrosaminas (Masson e Montel, 1995).

Os trabalhos de Miruish (1970) citados por Shahidi *et al.* (1993), revelam que a formação de nitrosaminas é directamente proporcional ao conteúdo em aminas da carne e à concentração de nitrito residual. Por sua vez, Eerola *et al.* (1998), referiram estar demonstrado que o factor limitante da formação de nitrosaminas voláteis não é a disponibilidade de aminoácidos precursores de aminas, mas sim, a concentração de agentes de nitrosação como o nitrito e nitrato residuais. Consequentemente, só se poderá evitar a sua formação através da implementação de alterações de carácter tecnológico no processamento industrial dos produtos (Shahidi *et al.*, 1993).

De acordo com Townsend e Olson (1994), em enchidos secos curados só se encontram nitrosaminas de forma esporádica, mas cujos valores podem aumentar com o tempo de cura e armazenamento. No entanto, não se pode afirmar que estas escassas quantidades de nitrosaminas que se formam em enchidos secos (0,08 a 0,24 µg/100g) e com os habituais métodos de fabrico, sejam suficientes para possuir importância relevante na formação de cancro no Homem (Wirth, 1992; Sebranek e Cassens, 1973 citados por Masson e Montel, 1995).

As aminas biogénicas estão relacionadas com a deterioração dos alimentos, já que podem resultar da actividade proteolítica e aminoácido-descarboxilase da microflora contaminante indesejável. Desta forma, estes compostos podem ser utilizados como indicadores da extensão da deterioração de alguns alimentos como é o caso da histamina, da tiramina, da agmatina, da putrescina e das poliaminas naturais espermina e spermidina (Bover-Cid *et al.*, 1999a; Bover-Cid e Holzapfel, 2000).

3.3 - Teores de aminas em enchidos secos curados

Nos enchidos secos curados, os teores de aminas biogénicas variam segundo a origem do produto. É normal encontrarem-se teores de aminas totais que variam entre 25 e 200 mg/100g de produto expresso em matéria seca (Demeyer, 1992).

Como se pode verificar na tabela 1.5, a tiramina é geralmente a amina biogénica mais abundante. Estão descritas concentrações que variam entre 1 e 151 mg/100g de matéria seca em

enchidos de várias origens. Seguem-se a putrescina, com teores entre 1 e 19 mg/100g de matéria seca, a histamina e a cadaverina, com valores próximos (Vandekerckhove, 1977; Standara *et al.*, 1994; Montel *et al.*, 1996; Shalaby, 1993).

Tabela 1.5 – Teores médios de aminos (mg/100g de matéria seca) em enchidos secos de diversas origens.

Origem dos produtos	Triptamina	β-Fenil-etilamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina
Bélgica ¹	nd	1	15	2	4	37	nd	nd
França ¹	nd	1	19	17	14	56	nd	nd
Espanha ²								
chouriço	4	0,2	16	2	4	32	0,4	2
salsichão	3	2	13	3	3	30	0,3	2
Holanda ³	nd	1	5	6	1	11	nd	nd
Noruega ⁴	nd	nd	1	nd	0,2	1	0,3	2
R. Checa ⁵	0,5	nd	11	3	3	10	0,5	3

(1) Vandekerckhove (1977); (2) Hernandez-Jover *et al.* (1996); (3) Ten Brink *et al.* (1990); (4) Hagen *et al.* (1996); (5) Standara *et al.* (1994); nd: não detectado

Seguindo o mesmo processo de fabrico, os teores em aminos dos enchidos secos fermentados variam igualmente de produto para produto. Assim, dos 50 enchidos analisados por Shalaby (1993) mais de 90 % apresentavam putrescina e cadaverina, 65 a 80% dos enchidos continham tiramina e triptamina, e menos de 55% dos enchidos apresentavam histamina, espermidina e espermina (tabela 1.6).

Tabela 1.6 – Variação dos teores em aminos (mg/100g de peso total) de 50 enchidos egípcios (Shalaby, 1993).

Aminas	Amostras positivas %	Concentração em aminos	
		Teores extremos	Teores médios
Triptamina	68	0,3-3,3	1,3
Putrescina	96	1,2-10,2	3,9
Cadaverina	94	0,6-3,9	1,9
Histamina	46	0,8-4,1	0,8
Tiramina	78	1-5,3	1,4
Espermidina	44	0,5-1,2	0,6
Espermina	54	0,2-0,5	0,3

Alguns autores descreveram aumentos de pelo menos 10 vezes na concentração de histamina, tiramina e putrescina nos primeiros dias de maturação, taxas que continuam a aumentar até ao final do processo. Simultaneamente ocorre uma diminuição da concentração dos aminoácidos precursores (Shalaby, 1993). Maijala e Eerola (1993) também verificaram que o

período de fermentação inicial de enchidos secos curados (do 3º ao 7º dia de maturação) se revela como a fase mais crítica na formação de aminas biogénicas. Após este período, e apesar de se continuar a verificar um aumento da produção de aminas, a sua velocidade de formação diminui.

Nos alimentos fermentados / maturados, como os enchidos secos curados, que não são estabilizados por um tratamento térmico, pode ocorrer a formação de aminas biogénicas durante o armazenamento.

Tiecco *et al.* (1985) citados por Marine-Fonte *et al.* (1995) classificaram as aminas de acordo com a sua evolução durante a conservação de enchidos secos curados da seguinte forma:

- a) Aminas que não variam: histamina, espermidina, putrescina e triptamina
- b) Aminas cuja concentração aumenta: tiramina, espermina e serotonina
- c) Aminas cuja concentração diminui: β -feniletilamina, cadaverina, e 1,3-diaminopropano.

3.4 - Factores com influência nos teores de aminas

A grande variação de concentração e de composição de aminas referidas pelos diferentes autores é com certeza influenciada pelas condições de fermentação do enchido e pela actividade da flora específica presente nestes produtos (Diaz *et al.*, 1995). Esta flora pode existir naturalmente nas matérias-primas, ser adicionada na forma de “starters”, ou ser introduzida por contaminação antes, durante ou após o processamento dos enchidos (Ten Brink *et al.*, 1990). Uma forte contaminação do meio com bactérias produtoras de aminas explicaria as concentrações elevadas destes compostos detectados no fim da maturação (Maijala *et al.*, 1995), já que, dados experimentais indicam uma correlação entre o número de bactérias e o teor em aminas biogénicas dos alimentos (Bover-Cid e Holzapfel, 2000).

De acordo com Halász *et al.* (1994) a actividade aminoácido-descarboxilase depende da composição do meio e da fase de crescimento dos microrganismos, verificando-se uma maior actividade enzimática na fase estacionária, que corresponde à fase final do período de fermentação.

Na tabela 1.7 estão representadas as espécies bacterianas que produzem algumas das aminas mais frequentes em alimentos.

Tabela 1.7 – Espécies bacterianas com estirpes produtoras de aminas em alimentos. Adaptado de Maijala (1994a); Masson *et al.* (1996a); Masson e Montel (1996); Santos (1998); Masson (1998); Eerola e Maijala (1999); Masson *et al.* (1999).

Bactéria Gram-negativo	1	2	3	4	5	6	Bactéria Gram-positivo	1	2	3	4	5	6
<i>Acinetobacter iwoffii</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus cereus</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Aeromonas hydrophila</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Bacillus subtilis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Citrobacter freundii</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Betabacterium buchneri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiella speiz.</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Betabacterium beve</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Betabacterium fermenti</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Carnobacterium divergens</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Enterococcus agglomeras</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Carnobacterium gallinarum</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Enterococcus durans</i>	-	+	-	-	-	-	<i>Carnobacterium maltaromicus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	+	+	+	+	-	+	<i>Carnobacterium piscicola</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Enterococcus faecium</i>	-	+	-	-	-	+	<i>Clostridium aerosoetidum</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Eschericia coli</i>	+	+	+	+	+	-	<i>Clostridium perfringens</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Eschericia freundii</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Clostridium sporogenes</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Hafnia alvei</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Kocuria varians</i>	-	+	-	+	+	-
<i>Klebisella pneumoniae</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	-	-	+	-	-	-
<i>Klebisella oxytoca</i>	+	-	+	-	-	-	<i>Lactobacillus alimentarius</i>	+	+	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	+	-	-	+	-	-	<i>Lactobacillus bavaricus</i>	+	+	+	+	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	+	+	-	-	-	+	<i>Lactobacillus brevis</i>	+	+	+	+	+	-
<i>Proteus vulgaris</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus buchneri</i>	+	+	-	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	+	+	-	-	+	-
<i>Pseudomonas fluorescens/putida</i>	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus carnis</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Pseudomonas putrefaciens</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus casei</i>	+	-	+	+	-	-
<i>Pseudomonas reptilivora</i>	+	+	-	-	-	+	<i>Lactobacillus curvatus</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella arizona</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	+	+	-	-	-	+
<i>Salmonella dublin</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus divergens</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhi</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus farcimines</i>	-	+	-	-	-	+
<i>Schewanella putrefaciens</i>	-	-	+	+	-	-	<i>Lactobacillus fermentum</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Serratia marescens</i>	+	-	+	+	-	-	<i>Lactobacillus frigidus</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Serratia liquefaciens</i>	+	+	+	+	-	-	<i>Lactobacillus helveticus</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Shigella boydii</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus hilgardii</i>	+	-	+	-	-	-
<i>Shigella dysenteriae</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus paracasei</i>	-	+	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	+	+	+	+	+
<i>Vibrio alginolyticus</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus reuteri</i>	+	-	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	+	-	-	-	-	-	<i>Lactobacillus sake</i>	+	-	-	-	-	-
							<i>Lactococcus lactis</i>	+	+	-	-	+	-
							<i>Leuconostoc cremoris</i>	-	+	-	-	+	-
							<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	+	+	-	-	+	-
							<i>Leuconostoc oenos</i>	-	+	-	-	-	-
							<i>Micrococcus kristinae</i>	-	-	-	+	-	-
							<i>Micrococcus luteus</i>	-	+	-	-	-	-
							<i>Oenococcus oenii</i>	+	+	-	-	-	-
							<i>Pediococcus acidilactici</i>	-	+	-	-	-	-
							<i>Pediococcus cerevisiae</i>	+	-	-	-	-	-
							<i>Pediococcus pentosaceus</i>	+	+	-	-	-	-
							<i>Staphylococcus carnosus</i>	-	+	+	+	-	+
							<i>Staphylococcus epidermidis</i>	+	-	-	+	-	+
							<i>Staphylococcus piscifermentans</i>	-	+	-	-	-	+
							<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	+	-	+	-	-
							<i>Staphylococcus xylosus</i>	+	-	-	-	-	-
							<i>Streptococcus cremoris</i>	+	+	-	-	-	-
							<i>Streptococcus durans</i>	+	+	-	-	-	-
							<i>Streptococcus faecalis</i>	+	+	-	-	-	+
							<i>Streptococcus faecium</i>	+	+	-	-	-	-
							<i>Streptococcus lactis</i>	-	+	-	-	-	-
							<i>Streptococcus mitis</i>	+	+	-	-	+	-
							<i>Streptococcus liquefaciens</i>	-	+	-	-	+	-
							<i>Weissella paramesenteroides</i>	-	+	-	-	+	-

(1) Histamina, (2) Tiramina, (3) Cadaverina, (4) Putrescina, (5) Triptamina, (6) β-Feniletilamina.
 (+) espécie amino-positiva; (-) não estudada ou amino-negativa.

É de notar que, nem todas as estirpes destas espécies são amino-positivas. Algumas estirpes têm um amplo espectro de acção, descarboxilando uma grande variedade de aminoácidos, enquanto que outras apenas produzem descarboxilases específicas para alguns aminoácidos (Sarkadi *et al.*, 1999).

Também se verificam grandes variações no teor de aminas produzidas por diferentes estirpes da mesma espécie (Maijala, 1994a; Bover-Cid e Holzapfel, 2000). No entanto, de acordo com o trabalho de Santos (1998), as *Enterobacteriaceae* parecem ser fortes produtoras de aminas biogénicas comparativamente com as bactérias do ácido láctico, *Micrococcus* e *Staphylococcus*.

Segundo os estudos de Masson *et al.* (1996a), as leveduras pertencentes aos géneros *Candida* e *Debaryomyces* produzem apenas histamina e, em muito menor quantidade, tiramina e β -feniletilamina.

Os pré-requisitos para a formação de aminas biogénicas por microrganismos são:

(i) a disponibilidade de aminoácidos livres (Rice *et al.*, 1976 citados por Vidal-Carou *et al.*, 1990a; Marklinder e Lonner, 1992 citados por Santos, 1996).

(ii) a presença de microrganismos descarboxilase-positivos, relacionada com a qualidade bacteriológica das matérias-primas e com as culturas “starters” adicionadas (Ten Brink *et al.*, 1990; Huis Veld *et al.*, 1990 citados por Santos, 1996; Montel *et al.*, 1996).

(iii) condições que permitam o crescimento bacteriano, a síntese de descarboxilases e a actividade destas (Ten Brink *et al.*, 1990; Gale, 1940 e Alin, 1950 citados por Masson *et al.*, 1997b).

O processo de fermentação dos enchidos proporciona os microrganismos e os aminoácidos livres necessários para a formação de aminas que, juntamente com factores ambientais, favorecem o crescimento bacteriano e a actividade descarboxilásica (Kranmer *et al.*, 1991a).

A qualidade das matérias-primas, a composição da mistura e os parâmetros tecnológicos condicionam estes factores. Assim, a temperatura, o pH, os aminoácidos livres e alguns aditivos têm sido os factores ambientais mais estudados entre os que podem propiciar a formação de aminas biogénicas (Maijala *et al.*, 1993b).

Qualidade das matérias-primas

Apesar de Demeyer (1992) referir que a carne de porco é mais susceptível à formação de aminas que a carne de bovino, e de Vidal-Carou *et al.* (1990b) terem verificado uma maior e mais rápida produção de histamina e tiramina na carne de porco, tanto à temperatura ambiente como de refrigeração, Zee *et al.* (1983) citados por Masson (1998), não verificaram o mesmo

(tabela 1.8). A espermina e a espermidina são as aminas maioritariamente presentes na carne fresca. Estas poliaminas parecem ocorrer naturalmente na carne fresca de porco e de bovino, e a sua formação não se deve a processos de deterioração ou fermentação (Hernández-Jover *et al.*, 1996). Hernández-Jover *et al.* (1997b) verificaram uma diminuição da espermina durante a produção dos enchidos, mantendo-se as concentrações de espermidina relativamente constantes. De acordo com Bardócz (1999), a diminuição da espermina durante o processo de maturação pode resultar da utilização desta poliamina, por microrganismos, como fonte de azoto.

Tabela 1.8 – Teor médio em aminas de carnes cruas (mg/100g de produto expresso em matéria seca) (Zee *et al.*, 1983 citados por Masson, 1998).

Carne	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina
Frango	3	0,14	0,8	1,6	17	69
Porco	0,9	nd	0,2	1	24	136
Bovino	4	5	21	1,5	31	133

Carnes cortadas e conservadas 5 dias a 0°C.

Os teores em aminas variam igualmente para a mesma espécie animal (tabela 1.9). Lakritz *et al.* (1975), citados por Masson (1998), explicam esta variabilidade pelos tratamentos pré- e pós-abate dos animais (origem do animal, condições de abate, armazenamento das carcaças) e pelo nível de contaminação das carcaças. Também, Maijala (1994a) detectou diferentes teores de histamina, tiramina e putrescina em enchidos elaborados com diferentes amostras de carne da mesma espécie, mas utilizando os mesmos recipiente, cultura iniciadora e programa de processamento.

Tabela 1.9 – Variação dos teores em aminas (mg/100g de carne) da carne de porco (Lakritz *et al.*, 1975 citados por Masson, 1998).

	Triptamina	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Tiramina	Espermidina	Espermina
Mínimo	1,2	1,7	1,3	0,5	0,5	13	1,2
Máximo	3	189	48	2,3	4	125	56

Carne de porco picada a 4°C e analisada imediatamente.

O tempo e a temperatura de armazenamento influenciam os teores em aminas das carnes. De acordo com Masson *et al.* (1997a), as temperaturas de refrigeração diminuem o risco de produção de aminas na carne fresca. Assim, os teores em putrescina, cadaverina, espermina e espermidina da carne de porco conservada 15 dias a 4°C não excedem os 10 mg/100g. A 20°C, as

quantidades de espermina e espermidina não variam após 4 dias de armazenamento, no entanto, as concentrações em putrescina e cadaverina aumentam significativamente após 48h.

O prolongamento do tempo de armazenamento das carnes a baixas temperaturas pode igualmente acarretar um aumento dos teores de amins (Masson, 1998). Kranter *et al.* (1991a) verificaram um aumento do teor em histamina na carne de porco em função do tempo de armazenamento (5, 7 e 10 dias após o abate a 7°C).

Baráth e Halász (1995), da mesma forma que os autores anteriores, analisaram a evolução dos teores em amins da carne de porco durante o armazenamento a diferentes temperaturas, verificando um aumento dos teores de putrescina e cadaverina e uma diminuição dos teores de espermidina e espermina (tabela 1.10). Estes resultados devem-se provavelmente a alterações na relação entre a síntese de amins e a sua desaminação. Os teores de putrescina, de cadaverina, de espermidina e de espermina variam menos durante o armazenamento a -20°C do que a 5°C (Halász e Baráth, 1998).

Tabela 1.10 – Teores em amins (mg/100g) da carne de porco fresca e armazenada durante 8 e 15 dias a 5°C e -20°C (adaptado de Baráth e Halász, 1995).

Amina	Carne fresca	Armazenamento a 5°C		Armazenamento a - 20°C	
		8 dias	15 dias	8 dias	15 dias
Putrescina	0,78	1,69	2,69	0,94	1,12
Cadaverina	1,33	3,86	5,37	2,75	4,12
Histamina	0,47	0,47	0,40	0,05	0,05
Espermidina	0,70	0,23	0,23	0,46	0,43
Espermina	6,71	4,22	3,12	5,86	4,28

Baráth e Halász (1995) estudaram a influência do pH da carne de porco nos teores das principais amins biogénicas e poliaminas naturais, verificando diferenças entre as carnes com pH normal, PSE (pale, soft, exudative) e DFD (dark, firm, dry) (tabela 1.11).

Tabela 1.11 – Teores das amins biogénicas (mg/100g) em carne de porco com diferentes valores de pH (adaptado de Baráth e Halász, 1995).

pH	Putrescina	Cadaverina	Histamina	Espermidina	Espermina
Normal (=5,8)	0,71	1,07	0,56	0,88	6,01
PSE (<5,8)	0,43	1,01	0,30	0,13	6,40
DFD (>5,8)	0,92	0,45	nd	2,50	6,80

Da mesma forma que os autores anteriores, Szerdahelyi e Fischer (1998) verificaram que, com exceção da espermína, as carnes com pH normal contêm mais aminas que as PSE.

Segundo Hernández-Jover *et al.* (1997b), as tripas naturais não contêm aminas biogénicas e, apenas a pimenta, de entre os condimentos que podem ser adicionados à carne no fabrico de enchidos, apresenta tiramina, histamina, putrescina e cadaverina, mas a sua contribuição em aminas para o produto final é mínima uma vez que é adicionada em pequena quantidade.

De acordo com Maijala *et al.* (1995), o tempo de descongelação das matérias-primas até 3 dias a 5°C pode ser efectuado sem risco de produção de aminas, desde que as culturas “starters” e as matérias-primas utilizadas sejam de boa qualidade.

Teor em aminoácidos livres

A disponibilidade de aminoácidos como substrato é essencial para a formação de aminas biogénicas. Assim, a taxa de aminoácidos livres dos produtos constitui um factor determinante na sua produção (Maijala, 1994a; Eerola e Maijala, 1999). No entanto, Simon-Sarkadi (2000) não verificou uma forte relação entre o aumento do teor de aminas biogénicas e a diminuição dos aminoácidos precursores em enchidos.

Em geral, nos alimentos frescos, a fracção de aminoácidos livres, precursores das aminas biogénicas, não é significativa. Com a degradação, ou em alimentos que são sujeitos a processos de fermentação / maturação, esta fracção aumenta por processos de proteólise, provocados por enzimas endógenas – procedentes da própria carne, ou por enzimas produzidas por microrganismos que cresçam de forma natural nas matérias-primas, ou que sejam adicionados na forma de culturas “starters” (Raemaekers e Demeyer, 1996).

De acordo com Diaz *et al.* (1996), o teor médio de aminoácidos livres nos produtos cárneos não excede 2 mM; uma produção superior a este valor é excepcional e muitas vezes resultado de uma proteólise excessiva.

Sal e principais aditivos químicos

Um teor elevado de sal parece inibir a formação de aminas em alimentos, provavelmente por retardar o crescimento bacteriano (Stratton *et al.*, 1991; Maijala, 1994a). No entanto, Straub *et al.* (1994) verificaram que a presença de sal em teores de cerca de 50g/L no meio favorece a produção de tiramina na presença de *Lactobacillus curvatus*.

Apesar do conhecimento sobre a influência dos nitratos e nitritos na formação de aminas biogénicas ser escassa, Straub *et al.* (1994) referem que estes aditivos não parecem exercer influência na sua produção, quando usados como ingredientes em enchidos. No entanto, Tschabrun *et al.* (1990) verificaram que a substituição de nitratos por nitritos diminui a

concentração final de histamina em 20%. Num estudo de Eerola *et al.* (1992), a adição crescente de nitrito de sódio não teve qualquer efeito na formação de aminas quando a fermentação decorreu com o auxílio de diferentes culturas “starters” comerciais. Apesar disto, para uma determinada cultura “starter” comercial (Pentoferment 85) detectou-se o nível mais baixo de aminas quando se adicionou a maior concentração de nitrito de sódio (200 mg/kg).

A presença de hidratos de carbono fermentescíveis como a glucose, estimula o crescimento e a actividade aminoácido-descarboxilase das bactérias. Uma concentração de glucose entre 0,5-2,0% tem sido descrita como óptima, enquanto que níveis superiores ou iguais a 3% inibem a formação destas enzimas (Halász *et al.*, 1994).

Buncic *et al.* (1993) verificaram uma produção de histamina e tiramina ligeiramente superior em enchidos com 0,3% de glucono- δ -lactona (GDL) (sem culturas iniciadoras) comparativamente com enchidos sem este aditivo (com e sem culturas starters). Contrariamente, Molly e Geenen (1996) referem que a adição de GDL aos enchidos pode inibir a produção de aminas pelos microrganismos, apesar da redução do pH ser, por vezes, demasiado drástica para as estirpes de *staphylococcus* que desempenham um papel importante no desenvolvimento do aroma. Maijala *et al.* (1993a) verificaram uma diminuição significativa dos teores de histamina e putrescina com a introdução de GDL aos enchidos. Com efeito, desde a primeira semana de maturação, 0,5% deste aditivo reduz em 20% a concentração de histamina e putrescina. Esta diminuição está correlacionada entre outros factores com a diminuição significativa ($p < 0,01$) da taxa de contaminação de bactérias produtoras de aminas (enterococos e coliformes).

Culturas iniciadoras (starters)

Os enchidos secos, sem adição de culturas iniciadoras, apresentam concentrações variáveis de aminas biogénicas, provavelmente devido a variações no processo de maturação e na composição da microflora responsável pela fermentação espontânea (Butturini *et al.*, 1995; Cantoni, 1995).

A introdução de culturas “starters” origina normalmente produtos com quantidades inferiores de aminas biogénicas, comparativamente com aqueles cuja fermentação ocorre pela microflora natural (Eitenmiller *et al.*, 1978; Maijala, 1993; Maijala *et al.*, 1995). Desta forma, apesar de Bauer *et al.* (1994) referirem que a adição de culturas “starters” não pode reduzir ou prevenir a formação de aminas biogénicas, Hernández-Jover *et al.* (1997b) verificaram que a formação de tiramina, putrescina e cadaverina pode ser reduzida pela utilização de culturas “starters” sem capacidade para a produção destas aminas biogénicas. No entanto, ainda de acordo com os resultados obtidos por estes autores, parece que a microflora natural presente na carne tem uma grande influência na formação de aminas biogénicas durante a maturação dos

enchidos. A utilização de “starters” diminui mas não previne a formação destas. Assim, a introdução de culturas iniciadoras pode afectar a produção de amins biogénicas directa ou indirectamente através da interacção com a flora de associação/contaminação (Ten Brink *et al.*, 1990; Eerola *et al.*, 1996).

De acordo com Molly e Geenen (1996), Masson *et al.* (1997a) e Bover-Cid *et al.* (2000) as culturas devem ser seleccionadas tendo em atenção, a ausência de actividade aminoácido-descarboxilase e a competitividade contra bactérias contaminantes, antes de serem utilizadas como “starters”. Desta forma, dependendo do tipo de microrganismos presentes nas matérias-primas, a combinação de fermentos como *Lactobacillus sake* e *Staphylococcus carnosus* ou *Staphylococcus xylosus* pode ser praticada sem risco para a saúde pública, tendo em conta a sua fraca produção de amins (Roig-Sagués e Eerola, 1997). Pelo contrário, as espécies *Lactobacillus curvatus* e *Lactobacillus plantarum* devem ser utilizadas com precaução devido à elevada formação de amins (β -feniletilamina, triptamina, tiramina, putrescina) libertadas para o meio (Masson *et al.*, 1996a, b, c).

Segundo Bodner *et al.* (2000), as culturas “starters” com elevada actividade proteolítica também aumentam potencialmente o risco de formação de amins biogénicas, pelo aumento da disponibilidade de aminoácidos livres, devendo ser, por isso, evitadas.

Temperatura

De acordo com Steinhart *et al.* (1996) e Halasz *et al.* (1994), e à semelhança do referido anteriormente para a carne fresca, a temperatura tem uma clara influência na formação de amins em enchidos.

Tendo em conta que a temperatura de fermentação em enchidos secos ocorre geralmente entre 15 e 26°C, as temperaturas mais baixas são preferíveis se se desejar um produto de alta qualidade e de longa viabilidade (Maijala *et al.*, 1994). Kranner *et al.* (1991b) verificaram uma maior formação de histamina a temperaturas de maturação mais elevadas (18°C) comparativamente com temperaturas mais baixas (7°C), especialmente com a adição de microrganismos produtores de histamina. Segundo Masson e Montel (1995) e Masson *et al.* (1997b), a temperatura óptima de produção de amins é variável segundo as espécies microbianas. As temperaturas baixas de armazenamento de enchidos não são suficientes para inibir a formação de amins tóxicas como a histamina (Ababouch *et al.*, 1991).

De acordo com Steinhart *et al.* (1996), quando o enchido é inoculado com culturas “starters” amino-negativas, constituídas por bactérias lácticas e *Staphylococcus carnosus*, obtém-se uma menor quantidade de amins biogénicas a 24°C do que a 14°C. Por outro lado, quando a carne é inoculada apenas com *Staphylococcus carnosus* e GDL (para uma descida rápida de pH)

é formada mais putrescina, cadaverina e tiramina às temperaturas mais elevadas. Parece que, no primeiro caso, as temperaturas altas estimulam o crescimento da cultura iniciadora, permitindo-lhe sobrepor-se ao crescimento da flora natural e resultando numa menor concentração de aminas. No segundo caso, o pH baixo e a rápida acidificação do meio podem ter contribuído para o aumento da proteólise das proteínas da carne, estimulando a formação de mais aminas.

Sayem-el-Daher *et al.* (1984), referiram que os níveis de putrescina, espermina, espermidina, cadaverina e tiramina estão correlacionados positivamente com a temperatura e com o tempo de armazenamento dos produtos. De acordo com os trabalhos de Bover-Cid *et al.* (2000), os enchidos fermentados de forma espontânea mostraram um aumento dos teores de tiramina, cadaverina e β -feniletilamina, e uma diminuição dos teores de putrescina, histamina, espermina e espermidina, com o armazenamento a 19°C e a 4°C (tabela 1.12). A produção de aminas biogénicas durante o armazenamento de enchidos fermentados parece estar relacionada com a sobrevivência de microrganismos no produto final, ou com a actividade residual de descarboxilases produzidas por microrganismos nas fases iniciais do processo de maturação. As temperaturas de refrigeração reduzem a actividade dos microrganismos e das enzimas residuais, o que resulta em menores alterações observadas a 4°C. Em contraste, a 19°C o processo pode ser semelhante a uma maturação longa.

Tabela 1.12 – Alterações nos teores em aminas (mg/100g de matéria seca) durante o armazenamento de enchidos fermentados a 4°C e a 19°C (adaptado de Bover-Cid *et al.*, 2000).

	Produto final ^a	Armazenamento a 4°C	Armazenamento a 19°C
Triptamina	0,063	0,047	0,144
β -feniletilamina	0,032	0,037	0,082
Putrescina	0,517	0,489	0,381
Cadaverina	2,218	2,358	3,193
Histamina	0,045	0,041	0,034
Tiramina	8,369	11,396	11,443
Espermidina	0,784	0,653	0,544
Espermina	5,367	4,182	3,715

^a enchidos após 21 dias de maturação

pH

De acordo com Masson *et al.* (1997a), o pH ácido (< 5,8) dos produtos cárneos não inibe a produção de aminas biogénicas. Pelo contrário, a actividade das aminoácido-descarboxilases é mais forte em meio ácido, com um pH óptimo entre 4,0 e 5,5 (Teodorovic *et al.*, 1994). Para além disto, neste ambiente, as bactérias são fortemente encorajadas a produzir estas enzimas, já que, a produção de aminas biogénicas, com a sua natureza básica, faz parte do mecanismo de

defesa dos microrganismos contra os ambientes ácidos (Maijala e Eerola, 1993; Olson, 1993). No entanto, quando a descida de pH é mais acentuada, nas primeiras 48 horas de fermentação, a produção de aminas é menor, devido à dificuldade de crescimento por parte da maioria dos microrganismos, à excepção das bactérias do ácido láctico (Maijala, 1994b). Estas, por sua vez, encontram condições óptimas para a produção de aminas, precisamente a pH ácido (Masson *et al.*, 1996a).

Actividade da água (a_w)

Treviño *et al.* (1997a) estudaram a concentração de aminas biogénicas em três secções (central, média e exterior) de um enchido seco típico alemão (cervelat). Estes autores, verificaram ser a secção externa, onde a desidratação do produto é mais intensa e consequentemente a a_w mais reduzida, aquela que apresentava concentrações mais baixas das principais aminas detectadas (putrescina, tiramina e espermina). Este resultado sugere uma influência marcada da baixa a_w na formação de aminas biogénicas pelo facto de inibir a actividade aminoácido-descarboxilase dos microrganismos.

Bover-Cid *et al.* (1999a) e Bover-Cid *et al.* (1999b) verificaram que, quanto maior é o diâmetro do enchido maior é a produção de aminas biogénicas, especialmente de putrescina e de tiramina, já que, maior é a a_w e menor a concentração de sal.

Embalagem sob vácuo

Eerola *et al.* (1997) estudaram a formação de aminas biogénicas em enchidos secos fatiados e embalados sob vácuo, armazenados a 4 e 10°C durante 58 dias, verificando apenas um aumento significativo da tiramina e putrescina com valores máximos de 15 mg/100g e 28 mg/100g, respectivamente. De acordo com os autores, a formação de aminas após o fabrico de enchidos pode ocorrer devido à contaminação destes, durante o corte e embalagem, com microrganismos descarboxilase-positivos. A embalagem sob vácuo, permitindo condições de anaerobiose, também pode favorecer a actividade de bactérias produtoras de aminas, presentes nos enchidos desde o seu fabrico. Por outro lado, tem sido referido que um baixo potencial redox do meio também estimula a produção de histamina, e a actividade da histidina descarboxilase parece ser inactivada ou destruída na presença de oxigénio (Halász *et al.*, 1994). Segundo Pipek *et al.* (1992), não se verifica a formação de histamina durante o armazenamento dos enchidos, se estes forem embalados sob vácuo em peça inteira.

3.5 – Inativação de amins biogénicas

As amins biogénicas são metabolizadas por enzimas, designadas por mono-, di- e poliaminoxidases (Morgan, 1998), através da seguinte reacção (Leuschner *et al.*, 1998):



As aminoxidases estão presentes em organismos superiores e também foram descritas em microrganismos (Bockhardt *et al.*, 1996). De acordo com os estudos de Leuschner *et al.* (1998), valores elevados de glucose e sal, e baixos de temperatura e pH, exercem um efeito negativo na degradação de amins em enchidos. O nitrito de sódio também pode inibir a actividade das aminoxidases, especialmente das diaminoxidases (Kanny, 1999).

Na tabela 1.13 estão representadas algumas das estirpes microbianas que se podem encontrar em enchidos e que exibem potencial para degradar a tiramina e a histamina num sistema tampão durante 24 horas a 30°C. Apesar da tabela 1.13 apresentar um maior número de estirpes microbianas com capacidade para catabolizar a histamina em enchidos, de uma forma geral, a tiramina é catabolizada com maior eficiência que a histamina (Leuschner *et al.*, 1998; Leuschner e Hammer, 1998).

Tabela 1.13 – Microrganismos com capacidade para catabolizar a histamina e/ou a tiramina (adaptado de Leuschner *et al.*, 1998).

ESTIRPE	HISTAMINA	TIRAMINA
<i>Lactobacillus plantarum</i>	+	-
<i>Lactobacillus sake</i>	+	-
<i>Lactobacillus pentosus</i>	+	-
<i>Pediococcus acidilactici</i>	+	-
<i>Micrococcus sp.</i>	+	+
<i>Geotrichum candidum</i>	-	+

3.6 - Limites legais para a presença de amins biogénicas

Apesar de serem detectados níveis elevados de amins biogénicas em enchidos secos curados, não existem limites legais admitidos. Os níveis tóxicos de algumas amins biogénicas em alimentos são: 10mg de histamina/100g, 10-80mg de tiramina/100g e 3mg de β-feniletilamina/100g (Ten Brink *et al.*, 1990).

De acordo com Santos (1996), teores totais de amins da ordem de 100mg/100g (amina/alimento) é considerado perigoso.

Mietz e Karmas (1977), definiram um índice de amins biogénicas (BAI) nos alimentos expresso pela fórmula:

$$BAI = \frac{\text{Histamina} + \text{Cadaverina} + \text{Putrescina}}{1 + \text{Espermina} + \text{Espermidina}}$$

A fórmula resulta da observação de que durante o processo de decomposição dos alimentos se verifica um aumento dos teores de histamina, cadaverina e putrescina e simultaneamente uma diminuição dos teores de espermina e espermidina.

Nos alimentos em elevado estado de decomposição os teores de espermina e espermidina podem cair para zero o que explica a necessidade do factor 1 no denominador do índice.

Um índice inferior a 1 caracteriza um produto de qualidade microbiológica. Pelo contrário, produtos fortemente contaminados apresentam índices superiores a 10 (Karmas, 1981).

De acordo com Moret *et al.* (1996a e 1996b) e Sarkadi *et al.* (1999), a determinação analítica das amins biogénicas em alimentos é considerada útil por duas razões: devido à toxicidade de algumas destas amins; e porque podem representar um índice de qualidade dos alimentos, altamente relacionado com as condições de higiene do processo de produção.

Para que o teor de amins biogénicas dos enchidos seja mínimo, é importante que se tomem alguns cuidados (Bardócz, 1999):

- 1 – Selecção de matérias-primas com baixos teores de amins biogénicas;
- 2 – Higiene na manipulação e no processamento;
- 3 – Utilização de culturas “starters” sem ou com baixa actividade descarboxilásica;
- 4 – Controlo das condições de embalagem, armazenamento e transporte.

De acordo com Eerola *et al.* (1997), enchidos secos com teores vestigiais de amins biogénicas indicam condições de higiene e boas práticas de fabrico durante o processamento. Por esta razão, a determinação das amins biogénicas deve ser incluída no controlo de qualidade destes produtos, permitindo desta forma a comercialização de enchidos que não constituam risco para a saúde pública.

II - PARTE EXPERIMENTAL

1 - AMOSTRAS

1.1 – PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As linguiças analisadas neste trabalho experimental foram fabricadas na secção de Indústrias Alimentares da Universidade de Trás-os-Montes e Alto Douro.

Foram fabricados dois lotes de linguiça: um foi processado de acordo com a receita tradicionalmente utilizada na região e ao outro foi adicionado um aditivo químico antioxidante / acidulante que, pela sua importância na formação e estabilização da cor de cura e pelo seu contributo para a conservação, é utilizado com frequência na indústria.

1.1.1 – Selecção dos ingredientes e formulação

Matéria-prima base

A carne utilizada no fabrico das linguiças era proveniente de fêmeas de raça Bízara e Bízara cruzada com Large White×Landrace (50:25:25).

Às 24 h *post-mortem* foi determinado o pH na perna direita para despiste de carnes DFD. Por motivos logísticos não foi possível medir o pH aos 45 minutos para despiste de carnes PSE. A carne dos 2 animais utilizados apresentou valores de pH de 5,62 e 5,88.

Após a desmancha, constituiu-se um lote de 60 kg de carne composto por cerca de 30% de pá, 30% de perna, 25% de barriga e 15% de lombo. Por forma a homogeneizar o lote de matéria-prima, a carne cortada em pedaços foi misturada e picada grosseiramente numa picadora de discos (Ø 30 mm) e misturada numa misturadora de pás durante 10 minutos. Finda esta operação, a mistura de carne foi dividida em porções de 15 kg e congelada a -20°C, onde permaneceu 10 dias até ser utilizada nos dois fabricos de linguiça em estudo.

Tripa

Utilizou-se intestino delgado de suíno fresco. As tripas foram submetidas ao processo normal de lavagem no matadouro, viradas e conservadas em sal grosso a $4\pm 2^\circ\text{C}$ durante 3 dias. Dois dias antes do enchimento foram lavadas abundantemente com água corrente, temperadas com *Vinha d'alhos* (7L de vinho, 500g de sal, 250ml de massa de alho) e conservadas até ao dia do enchimento a $4\pm 2^\circ\text{C}$. No dia do enchimento, as tripas foram novamente lavadas abundantemente com água corrente e viradas, sendo conservadas em frio até ao momento da utilização.

Condimentos

Na condimentação utilizou-se sal refinado, vinho tinto da região com um teor alcoólico de 11° e um pH de 3,8 e massa de alho, obtida por trituração em picadora de discos.

Aditivos

- Sal de cura: sal, nitrito de sódio (E₂₅₀) e nitrato de potássio (E₂₅₂)
- Mistura antioxidante / acidulante: 70% de lactose, 15% de ácido ascórbico (E₃₀₀), 10% de glucono- δ -lactona (E₅₇₅) e 5% de ácido cítrico (E₃₃₀).

A formulação dos dois lotes de linguiça foi feita de acordo com o quadro 2.1, tendo sido adicionada ao segundo lote a mistura antioxidante / acidulante numa percentagem de 1% relativamente ao peso total.

Quadro 2.1 - Formulação da linguiça.

Ingredientes	Percentagem
Mistura de carne e gordura	90,3
Vinho tinto da região	7,6
Sal	1,0
Alho	0,8
Sal de cura	0,3

Para além da tradicional *Vinha d'alhos*, adicionou-se nitrificante (sal de cura), dada a sua importância quer a nível sensorial quer higio-sanitário.

1.1.2 – Corte das carnes

Em cada fabrico foram descongeladas, durante 24h a $6\pm 2^{\circ}\text{C}$, 2 embalagens de 15 kg de mistura de carne. Esta, ainda semi-congelada, foi picada numa picadora de discos (\varnothing 15mm).

1.1.3 – Mistura e repouso da massa

A carne picada foi transferida para uma mechedeira de pás, sendo adicionadas fraccionadamente, com homogeneização intermédia:

- uma mistura de vinho + sal + alho + nitrificante
- uma mistura antioxidante / acidulante dissolvida em 100ml de água (apenas no 2º fabrico).

Seguiu-se a homogeneização durante 10 minutos, invertendo o sentido de rotação das pás a cada 2 minutos. Nesta operação, a temperatura da massa nunca ultrapassou os 5°C .

A massa foi transferida para uma caixa plástica fechada e repousou a $4\pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 3 dias.

1.1.4 - Enchimento

No enchimento da tripa utilizou-se uma enchedeira pneumática. As linguiças foram atadas em forma de ferradura, tendo um comprimento total de cerca de 30cm.

Tendo-se trabalhado com tripa natural fresca, as linguiças, depois de colocadas nas varas, escorreram à temperatura ambiente de $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ durante cerca de 1h.

1.1.5 - Fermentação - 1ª fase da maturação

As linguiças foram colocadas na câmara de secagem a 15°C com 85% de humidade relativa durante 24h.

1.1.6 - Fumagem

A fumagem foi realizada numa câmara com gerador eléctrico de fumo a partir de aparas de madeira de faia.

O ciclo de fumagem compreendeu 15 minutos de secagem, 10 minutos de secagem com ignição do fumo, 2h de fumo frio, 10 minutos de repouso e 5 minutos de evacuação do fumo. Excepto a última fase, todas decorreram a baixa velocidade de circulação de ar (7000 rpm do ventilador). A humidade relativa programada para todas as fases foi de 85% e a temperatura máxima atingiu os $32\pm 3^{\circ}\text{C}$.

1.1.7 – Secagem – 2ª fase da maturação

Após fumagem, as linguiças foram colocadas novamente na câmara de secagem a 15°C com 85% de humidade relativa durante 30 dias.

1.1.8 – Embalagem

O produto final foi embalado sob vácuo e conservado a -20°C durante 45 dias.

1.2 - AMOSTRAGEM

Foram recolhidas 5 amostras, com e sem mistura antioxidante / acidulante, de cada um dos 5 tempos de fabrico / armazenamento estudados:

Tempo 1 – No final da fase de tempero (dia 3)

Tempo 2 – Após fumagem (dia 5)

Tempo 3 – Durante a secagem (dia 10)

Tempo 4 – Produto final (dia 35)

Tempo 5 – Após armazenamento (dia 80)

1.3 – PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

No tempo 1 (T1) foram recolhidas 5x50 grama de amostras de cada fabrico, tendo sido trituradas numa picadora Moulinex, homogeneizadas e armazenadas em porta-amostras a -20°C até ao momento de serem analisadas. Em cada um dos outros tempos recolheram-se 5 linguças de cada fabrico, retiraram-se as tripas e procedeu-se à trituração, homogeneização e armazenamento como para o tempo 1.

Para a determinação do teor em azoto não proteico e do teor em aminoácidos livres procedeu-se à preparação de um extracto de acordo com Dierick *et al.* (1974):

- A 5 grama de amostra, picada e homogeneizada, adicionar 25 ml de ácido tricloroacético a 50%
- Homogeneizar a mistura em Ultra-Turrax a 8000 rpm durante 2 minutos
- Centrifugar durante 10 minutos a 3000 rpm
- Filtrar o sobrenadante em papel Whatman nº 54 para balão volumétrico de 50 ml
- Lavar o filtro e perfazer o volume com água destilada

O extracto assim obtido foi armazenado a -20°C até ao momento das análises.

2 – PARÂMETROS ANALÍTICOS DETERMINADOS

Neste trabalho, procedeu-se à determinação, nos cinco tempos referidos anteriormente do processo de fabrico / armazenamento das linguças e para os dois ensaios estudados (com e sem mistura acidificante / antioxidante), de:

- Parâmetros indicadores de estabilidade como a a_w , o pH e a humidade (%);
- Parâmetros indicadores de proteólise como o teor de azoto total (NT), de azoto não proteico (NPN) e de aminoácidos livres (AA), expressos em mg/100g de matéria seca;
- Teores de 6 aminas biogénicas (a triptamina, a β -feniletilamina, a putrescina, a cadaverina, a histamina e a tiramina) e de 2 poliaminas naturais (a espermidina e a espermina), expressos em mg/100g de matéria seca, através de uma técnica de HPLC optimizada neste trabalho.

Tratamento dos dados e apresentação dos resultados

O efeito do tempo de fabrico e da adição da mistura acidificante / antioxidante foi avaliado por análise de variância. As médias foram comparadas através do teste de Tukey Kramer (Statistica 4.3, StatSoft Inc 1998). Os resultados de NT, NPN e AA são apresentados em mg de azoto (N) por 100g de produto expresso em matéria seca, e os resultados das aminas são apresentados em mg de amina por 100g de produto expresso em matéria seca.

2.1 – PARÂMETROS INDICADORES DE ESTABILIDADE

A a_w é um parâmetro que exprime a fracção de água do alimento que está disponível para participar em reacções físico-químicas, bioquímicas e microbiológicas (Labuza, 1980 citado por Patarata e Martins, 1991). A sua influência faz-se sentir tanto ao nível de mecanismos químicos e bioquímicos (oxidação lipídica, escurecimento não enzimático, alteração de pigmentos, alteração da textura, perda de nutrientes e alteração da actividade enzimática), como microbiológicos. A acção da a_w sobre a microflora do alimento assume particular importância, na medida em que o seu controlo permite conservar determinados produtos sem recurso à refrigeração, sem risco de deterioração e perigo para a saúde do consumidor. A função estabilizadora da redução da a_w nos alimentos é devida à limitação das condições óptimas de multiplicação e actividade metabólica dos microrganismos envolvidos nas alterações dos produtos e nas toxinfecções alimentares. A acção inibidora da a_w reduzida é potenciada pelo pH (Troller e Christian, 1978).

Dada a importância dos parâmetros a_w e pH para a conservação dos alimentos, Leistner e Rodel (1976) sugerem uma classificação para produtos cárneos, em função destes parâmetros, em conjugação com a temperatura de armazenamento; em 1979 surge a adaptação dessa classificação, estabelecendo-se a directiva sanitária nº77/99/CEE de 21 de Dezembro (Crespo, 1982) (quadro 2.2).

Quadro 2.2 – Condições de armazenamento de produtos cárneos em função da a_w e pH (directiva sanitária nº77/99/CEE de 21 de Dezembro de 1979, Crespo, 1982).

CATEGORIA	CRITÉRIO	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO
Estáveis	$a_w \leq 0,95$ e $pH \leq 5,2$	não necessitam de refrigeração
	ou $a_w \leq 0,91$	
	ou $pH \leq 4,5$	
Alteráveis	$a_w \leq 0,95$ ou $pH \leq 5,2$	$\leq + 10^\circ\text{C}$
Facilmente alteráveis	$a_w > 0,95$ e $pH > 5,2$	$\leq + 5^\circ\text{C}$

De acordo com o quadro anterior, os produtos secos curados são estáveis à temperatura ambiente apresentando geralmente $a_w \leq 0,91$ ou $a_w \leq 0,95$ e $pH \leq 5,2$.

A percentagem de humidade dos alimentos está intimamente relacionada com a a_w . A maioria dos produtos de salsicharia tradicional portuguesa situam-se na categoria de alimentos com humidade intermédia, apresentando valores de a_w entre 0,90 e 0,60, já que, não sendo produtos de pH reduzido, têm a sua estabilidade geralmente assegurada pelo efeito isolado da a_w (Gauthier *et al.*, 1986; Leistner, 1990).

Por forma a poder acompanhar a evolução dos parâmetros responsáveis pela estabilidade dos produtos analisados, foram determinados a a_w , o pH e o teor em humidade em cada um dos tempos de fabrico / armazenamento.

2.1.1 – Actividade da água (a_w)

A actividade da água foi determinada no homogeneizado da amostra através de um aparelho Rotronic AG com uma sonda WA40, mantida a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

2.1.2 – pH

O pH foi medido directamente no homogeneizado da amostra, por introdução de um eléctrodo combinado acoplado a um medidor de pH Crison, logo após a sua recolha e antes da refrigeração. A determinação do pH foi feita em triplicado para cada amostra.

2.1.3 – Determinação da humidade

A determinação da humidade foi efectuada de acordo com a A.O.A.C. (1990) sendo a perda de massa sofrida pela amostra quando submetida a dessecação em estufa a 105°C até peso constante. A massa perdida foi expressa em percentagem de água. A percentagem de matéria seca (MS) da amostra calcula-se:

$$\frac{\text{Peso da amostra dessecada} \times 100}{\text{Peso da amostra}}$$

A determinação da humidade foi realizada em duplicado para cada amostra analisada.

2.2 – PARÂMETROS INDICADORES DE PROTEÓLISE

A proteólise que ocorre ao longo do processo de fabrico dos enchidos secos curados, e especialmente durante a fase de maturação, resulta da acção de proteases, enzimas que quebram ligações peptídicas (Correia e Correia, 1985; Hilmes e Fischer, 1997). Este processo, origina um aumento constante, se bem que lento, da fracção de azoto não proteico (NPN), constituída

essencialmente por polipéptidos, péptidos e aminoácidos livres, podendo atingir teores superiores ou iguais a 20% do azoto total ou a 5-10 mg/g da matéria seca (Dierick *et al.*, 1974; Demeyer, 1992).

A produção destes compostos origina modificações sensoriais dos enchidos, especialmente relacionadas com a textura, mas também com o aroma e o sabor. Para além disto, e como os aminoácidos livres são precursores das aminas biogénicas, a sua determinação pode ser útil no estudo da relação entre a proteólise e a formação destes compostos (Bover-Cid *et al.*, 1999b e Bover-Cid *et al.*, 1999c).

A evolução dos compostos azotados, indicadores de proteólise, ao longo do processamento / armazenamento dos produtos foi estudada através da determinação dos teores em azoto total (NT), azoto não proteico (NPN) e aminoácidos livres (AA).

2.2.1 – Determinação do teor em azoto total

O teor em NT foi determinado de acordo com a NP 1612 (1979), pelo método de Kjeldahl.

O NT foi doseado por mineralização com ácido sulfúrico concentrado, que promove a transformação do azoto orgânico em iões de amónio na presença de sulfato de cobre e sulfato de potássio como catalizadores. A adição de uma base (hidróxido de sódio), provocou a libertação de amoníaco, sendo este destilado e recebido num excesso de solução de ácido bórico com indicador. O amoníaco combinado com o ácido bórico foi titulado pelo ácido clorídrico.

Sabendo que a proteína contém 16% de azoto, obtém-se o teor em proteína bruta do produto multiplicando o seu teor em azoto pelo factor 6,25.

2.2.2 – Determinação do teor em azoto não proteico

A determinação do teor em NPN foi efectuada de acordo com uma adaptação do método de Kjeldahl.

A 10 ml de extracto adicionaram-se 6 ml de ácido sulfúrico e uma dose de mistura catalizadora. Após mineralização, procedeu-se à destilação adicionando 85 ml de água destilada e 100 ml de hidróxido de sódio a 50%. A titulação do destilado foi efectuada com ácido clorídrico 0,02 N.

2.2.3 – Determinação do teor em aminoácidos livres

A determinação do teor em aminoácidos livres foi efectuada de acordo com o método de Sorensen (A.O.A.C., 1975).

Procedeu-se à neutralização de 5 ml de extracto com hidróxido de sódio a 30% e 5% utilizando a fenolftaleína como indicador. Em seguida adicionaram-se 5 ml de aldeído fórmico neutralizado e titulou-se com hidróxido de sódio 0,0125 N.

2.3 – AMINAS BIOGÉNICAS E POLIAMINAS NATURAIS

2.3.1 – Optimização de uma técnica de HPLC para o doseamento de 8 aminas em enchidos secos curados

Têm sido desenvolvidos vários métodos para dosear aminas em alimentos, no entanto, não existe uma metodologia que permita a quantificação simultânea das diversas aminas em todos os alimentos. A complexidade das matrizes, a presença de compostos interferentes e a ocorrência de várias aminas biogénicas na mesma alíquota de extracto dificultam a sua separação e quantificação. Deste modo, nenhuma das técnicas analíticas actuais tem a capacidade de ultrapassar todos os problemas analíticos decorrentes da grande diversidade de matrizes e de interferentes (Pinho *et al.*, 2000).

De entre as técnicas desenvolvidas para separar e quantificar aminas biogénicas, são de citar as cromatográficas que incluem: a cromatografia em camada fina (TLC), a cromatografia gasosa (GC) e a cromatografia líquida (HPLC). Esta última, tem sido preferencialmente utilizada, por permitir a determinação simultânea de várias aminas com elevada sensibilidade e resolução (Moret *et al.*, 1992).

As técnicas de HPLC envolvem geralmente uma reacção de derivatização química entre as aminas a quantificar e uma substância cromófora, com posterior detecção por UV ou fluorescência, dado que não possuem fluorescência nem absorvência no UV que permita a sua detecção directa com sensibilidade (Treptow e Askar, 1990 citados por Bockhardt *et al.*, 1996). Encontram-se descritos na literatura diferentes agentes derivatizantes que reagem com a função amina, sendo de destacar: o cloreto de dansilo (Carlucci e Karmas, 1988), o cloreto de dabsilo (Krause *et al.*, 1995; Bockhardt *et al.*, 1996; Romero *et al.*, 2000), o cloreto de benzoílo (Hwang *et al.*, 1997; Morley *et al.*, 1997; Yen e Hsieh, 1999), a ninidrina (Joosten e Olieman, 1986), a iodoplatina, a fluoresceína (Kalligas *et al.*, 1994), o *o*-ftaldeído (OPA) (Mentasti *et al.*, 1991; Izquierdo-Pulido *et al.*, 1993; Veciana-Nogues *et al.*, 1995; Hernández-Jover *et al.*, 1995) e o 9-fluorenilmetil cloroformato (Kirschbaum *et al.*, 1994) entre outros. Alguns destes derivatizantes só reagem com aminas primárias como a fluoresceína e o *o*-ftaldeído, e os derivados de dabsilo e de benzoílo não podem ser detectados em baixas concentrações ou de forma tão selectiva como os derivados fluorescentes correspondentes. O cloreto de dansilo é utilizado com frequência, já que permite a obtenção de derivados de aminas primárias e secundárias relativamente estáveis,

com boas propriedades cromatográficas, e que são rapidamente isolados através de uma extracção com um solvente. Estes derivados podem ser detectados por fluorescência de forma sensível e selectiva, e têm também provado ser úteis para identificação espectroscópica (Hayman e Gray, 1989 citados por Price *et al.*, 1992).

A formação dos derivados pode efectuar-se antes ou após separação dos compostos na coluna cromatográfica. A derivatização pré-coluna é geralmente mais utilizada porque envolve equipamento de HPLC mais simples. No entanto, a derivatização pós-coluna é mais reprodutível.

As colunas cromatográficas mais utilizadas na separação de aminas são as colunas de troca iónica e as colunas de fase reversa.

A escolha do tipo de detector (UV ou fluorescência) depende principalmente do tipo de matriz a analisar e do equipamento disponível. O detector UV é mais comum em laboratórios de análise do que o detector de fluorescência e permite uma sensibilidade da ordem dos nanogramas, geralmente suficiente para a análise de alimentos como enchidos, produtos cárneos, peixe e outros. O detector de fluorescência é mais sensível, o que permite a sua utilização em alimentos com teores muito baixos de aminas biogénicas.

Meitz e Karmas (1977) desenvolveram um método de HPLC para análise simultânea de histamina, cadaverina, putrescina, espermidina e espermina em peixe, após derivatização com cloreto de dansilo, adaptado mais tarde por Malle e Vallé (1996). O cloreto de dansilo foi ainda utilizado na quantificação de várias aminas, por diversos autores, em diferentes matrizes como, queijo (Moret *et al.*, 1992; Moret *et al.*, 1996a; Moret e Conte, 1996), carne e produtos cárneos (Eerola *et al.*, 1993; Vinci *et al.*, 1995; Moret *et al.*, 1996b; Paulsen *et al.*, 1997), azeitonas de mesa (Hornero-Méndez e Garrido-Fernández, 1994), legumes (Linares *et al.*, 1998; Shalaby, 2000) e sumos (Armas *et al.*, 1999) entre outras.

Estes métodos, que incluem uma etapa de derivatização pré-coluna, obrigam a um controlo cuidadoso dos tempos e temperaturas de reacção, por forma a garantir a estabilidade e reprodutibilidade dos derivados formados.

Neste trabalho, pretende-se estudar e otimizar uma metodologia para a quantificação simultânea de triptamina, β -feniletilamina, putrescina, cadaverina, histamina, tiramina, espermidina e espermina em enchidos, utilizando a derivatização pré-coluna com cloreto de dansilo.

2.3.1.1 – Equipamento

- Homogeneizador Ultra-Turrax T25, Janke & Kunkel.
- Centrífugas, modelos Heraeus Sepatech e Heraeus Instruments.
- Banho-maria, marca Heto.

- Evaporador de azoto modelo Pierce 18780, Reacti-Therm.
- Membranas filtrantes Schleider & Schull, 0,45µm, ME 25/41 ST.
- Banho de ultra-sons, marca Bandelin Sonorex RX 100.

Usou-se um cromatógrafo líquido (HPLC) Jasco, equipado com duas bombas perfusoras modelo PU-980, uma câmara de mistura HG-980-30 e um injector automático modelo AS-950.

Os sistemas de detecção usados foram um detector de díodos, Jasco, modelo MD-910 e um detector de fluorescência, Jasco, modelo FP-920, conectados em série.

A separação foi obtida com uma coluna cromatográfica de fase reversa, Kromasil 100 C18, com 25 cm de comprimento, 0,4 cm de diâmetro contendo partículas de 5 µm de diâmetro.

A recolha e tratamento dos dados foi efectuado pelo programa Borwin PDA Controller Software, também Jasco.

2.3.1.2 – Reagentes e padrões

Os padrões das aminas doseadas, na forma de sais hidrolóricos, foram fornecidos pela Sigma – St. Louis, MO, USA - (triptamina, putrescina, cadaverina, histamina e tiramina) e pela Aldrich – Milwaukee, WI, USA – (β-feniletilamina, espermidina e espermina). O padrão interno, 1,7-diaminoheptano foi fornecido pela Fluka – Buchs, Switzerland.

O reagente de par-iónico BEHPA e o derivatizante cloreto de dansilo (5-dimetilaminonaftaleno-1-sulfonil cloreto) foram fornecidos pela Aldrich. O metanol e o acetonitrilo tinham grau Lichrosolv e eram da marca Merck. Os restantes reagentes apresentavam grau de pureza p.a. e eram da marca Merck ou Fluka.

2.3.1.3 – Condições cromatográficas

Como uma boa separação das aminas derivatizadas, numa coluna de fase reversa, é difícil de conseguir com uma eluição isocrática, tem de ser aplicada uma eluição com gradiente (Paulsen *et al.*, 1997).

A melhor resolução cromatográfica dos compostos em análise, depois de terem sido experimentados alguns gradientes, foi obtida nas seguintes condições:

Eluente A – Solução aquosa de ácido fosfórico 0,5 mM, filtrada (filtro 0,45 µm) e desgaseificada em banho de ultra-sons.

Eluente B - Solução acetonitrilo / metanol numa proporção 50/50, desgaseificada em banho de ultra-sons.

Tabela 2.1 – Programa de gradiente

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	40	60
15	20	80
20	20	80
25	5	95
30	5	95
31	40	60

Fluxo – 1 ml / min.

Detecção – Foi utilizado um detector de díodos para quantificação das aminas, com registo dos cromatogramas a 254 nm.

No caso da triptamina e da β -feniletilamina, que existem em quantidades vestigiais nas amostras, é vantajosa a utilização do detector de fluorescência, que apresenta maior sensibilidade. O programa de fluorescência compreendia comprimentos de onda de excitação e de emissão a 252 nm e 500 nm, respectivamente. Os cromatogramas foram registados com ganho 10 até aos 19,3 min (os tempos de retenção da triptamina e da β -feniletilamina são 12,6 e 14,7 respectivamente) e com ganho 1 a partir deste momento até ao final da análise, de modo a permitir a utilização do mesmo padrão interno nos dois detectores dentro dos limites da escala.

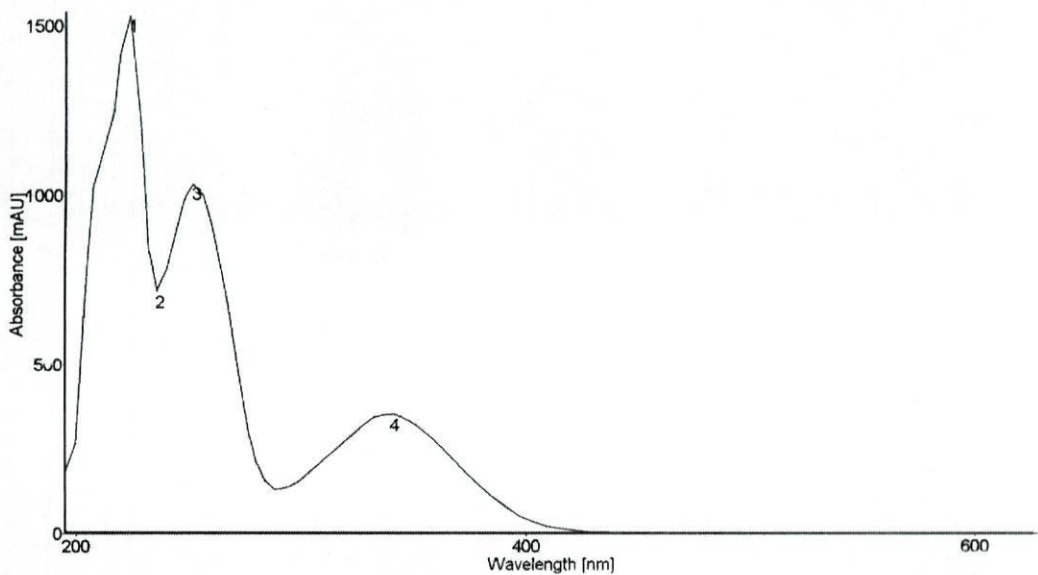
2.3.1.4 – Identificação dos compostos

Os compostos em estudo foram identificados por comparação dos seus tempos de retenção (t_R), dos espectros de UV e dos cromatogramas de fluorescência com padrões. A figura 2.1 mostra um espectro de UV característico de uma amina derivatizada com cloreto de dansilo.

Neste contexto, as substâncias interferentes são aminoácidos, os seus derivados e/ou subprodutos da reacção de derivatização.

A possibilidade de utilizar simultaneamente os detectores de UV e de fluorescência facilita a identificação destes picos interferentes, já que, grande parte deles absorve no UV mas não fluoresce nos comprimentos de onda impostos. A histamina é a única amina quantificada neste trabalho que apresenta um baixo quantum de fluorescência em relação à absorvência no UV, o que torna necessária a sua detecção por UV quando se encontra em pequena quantidade. Todas as outras aminas podem ser quantificadas pelos 2 detectores. Os cromatogramas de UV e de fluorescência obtidos com as amostras, são apresentados na parte de resultados e discussão deste trabalho.

Figura 2.1 – Espectro de UV de uma amina derivatizada com cloreto de dansilo.



	Tipo	WL (nm)	Abs (mAU)
1	Pico	223,00	1527,81
2	Vale	235,00	714,20
3	Pico	254,00	1031,70
4	Pico	339,00	349,17

2.3.1.5 – Optimização do método

Por forma a obter um método sensível e reproduzível para a detecção e quantificação de 8 aminas em enchidos, procedeu-se à optimização dos seguintes pontos: extracção sólido/líquido das amostras, purificação do extracto, pH e relação temperatura / tempo de derivatização, concentração de derivatizante, consumo do excesso de derivatizante, extracção das aminas derivatizadas e estabilidade dos derivados.

Para poder comparar os resultados obtidos foi estabelecido um protocolo experimental base, que a seguir se descreve.

Protocolo experimental - base

A 2,5g de amostra picada e homogeneizada adicionaram-se 62,5 µl de 1,7-diaminoheptano (10 mg/ml) como padrão interno (IS) e 12,5 ml de um ácido. Procedeu-se à homogeneização em Ultra-Turrax durante 2 minutos a 8000 rpm em copo de gelo por forma a evitar o aumento de temperatura. Centrifugou-se o homogeneizado anterior durante 10 minutos a

3000 rpm e, depois de se ter retirado a camada de gordura superficial, recolheu-se o sobrenadante. O resíduo sólido da amostra voltou a ser extraído com 12,5 ml do mesmo ácido através de agitação em vortex durante 1 minuto e centrifugação durante 10 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante voltou a ser recolhido e adicionado ao anterior.

Retiraram-se-se 400 µl do extracto anterior e adicionou-se 1 ml de solução saturada de bicarbonato de sódio (Na_2CO_3), acertando de seguida o pH a 11,5 com hidróxido de sódio (NaOH). Adicionou-se 1 ml de reagente derivatizante – cloreto de dansilo (7,5 mg/ml de acetona) e a reacção de derivatização foi realizada em banho-maria a 60°C durante 5 minutos, ao abrigo da luz. Adicionaram-se 100 µl de prolina (100 mg/ml) e protegeu-se da luz durante 15 minutos por forma a garantir o consumo do excesso do reagente derivatizante. Adicionaram-se 1,5 ml de tolueno, agitou-se em vortex e refrigerou-se a -20°C durante ± 15 min. para melhor separação das fases.

Retirou-se o sobrenadante e evaporou-se com azoto à secura a 60°C. Retomou-se com 300 µl de acetonitrilo e, após centrifugação a 13000 rpm durante 5 min., armazenou-se a -20°C até ao momento da injeção.

2.3.1.5.1 - Processo extractivo

Todos os métodos analíticos citados para a determinação de aminas em alimentos têm em comum duas fases: a extracção das aminas da matriz, que inclui a purificação do extracto, e a determinação dessas aminas (Moret *et al.*, 1992).

A primeira fase é a mais crítica já que condiciona a obtenção de recuperações satisfatórias para todas as aminas (Gennaro *et al.*, 1996).

A extracção das aminas de uma matriz sólida pode ser realizada com água, à temperatura ambiente ou a temperaturas elevadas, sendo apenas extraídas as aminas livres, ou num meio ácido, com ácido tricloroacético (TCA) (Hornero-Méndez e Garrido-Fernández, 1994; Paulsen *et al.*, 1997; Antolini *et al.*, 1999; Standara *et al.*, 2000), ácido perclórico (HClO_4) (Eerola, 1993; Shalaby, 1994; Malle e Vallé, 1996; Vallé e Malle, 1997; Duflos *et al.*, 1999) ou ácido clorídrico (HCl) (Chang *et al.*, 1985; Straub *et al.*, 1993; Bockhardt *et al.*, 1996) de modo a que as aminas ligadas a outros componentes da matriz também possam ser extraídas. Podem ainda ser utilizados vários solventes orgânicos como o metanol (Taylor *et al.*, 1978; Carlucci e Karmas, 1988), a acetona, o acetonitrilo/ HClO_4 ou o diclorometano/ HClO_4 .

O extracto obtido anteriormente pode ser derivatizado directamente (Eerola *et al.*, 1993; Malle e Vallé, 1996; Paulsen *et al.*, 1997; Vallé e Malle, 1997; Duflos *et al.*, 1999) ou ser sujeito a uma segunda extracção líquido/líquido para a separação das aminas de outros compostos interferentes, como aminoácidos, através da utilização de solventes orgânicos como o butanol

(BuOH) saturado em água (Hornero-Méndez e Garrido-Fernández, 1994; Valle e Glória, 1997; Arlorio *et al.*, 1999), o butanol/clorofórmio (Moret *et al.*, 1992; Moret e Conte, 1996; Moret *et al.*, 1996b) e o éter dietílico (Sanchez-Rodas *et al.*, 1996; Valle e Glória, 1997; Antolini *et al.*, 1999), ou de reagentes de par iónico como o bis-2-etilhexilfosfato (BEHPA) / clorofórmio (Fernandes e Ferreira, 2000a; Fernandes e Ferreira, 2000b).

Por forma a poder encontrar o melhor processo extractivo para a matriz em estudo testaram-se vários solventes extractores / purificadores.

Extracção sólido / líquido

Neste trabalho foram testados três ácidos com diferentes concentrações para a extracção sólido/líquido das aminas (tabela 2.2).

Tabela 2.2 – Ácidos e concentrações testadas para extracção das aminas da matriz sólida.

Ácido	Concentração
TCA	10%
	5%
HClO ₄	0,6 M
	0,4 M
HCl	0,1 M

Os cromatogramas, resultantes da extracção com cada um dos ácidos e concentrações, foram analisados, por forma a detectar substâncias interferentes e comparar as áreas e relação de áreas (amina/IS) obtidas para cada amina.

De acordo com Zee *et al.* (1983) citados por Paulsen *et al.* (1997), a eficiência da extracção depende não só do método utilizado mas também da matriz e da estrutura das aminas a quantificar. O HCl e o HClO₄ são citados com muita frequência para a extracção de aminas em queijos. No entanto, a utilização do HCl, neste caso, resultou na turvação do extracto e num cromatograma com picos mal resolvidos.

A tabela 2.3 mostra os resultados da relação de áreas em percentagem das aminas doseadas para cada ácido e concentração testados.

Tabela 2.3 – Resultados das relações de áreas (%) obtidas para cada ácido e concentração utilizados na extracção.

Amina	Amina/IS (%)				
	TCA 10%	TCA 5%	HClO ₄ 0.6M	HClO ₄ 0.4M	HCl 0.1M
Triptamina	100	94	52	35	45
β-Feniletilamina	70	90	100	63	0
Putrescina	100	97	96	91	100
Cadaverina	100	93	97	89	92
Histamina	100	97	96	88	83
Tiramina	99	94	100	90	88
Espermidina	40	100	88	70	80
Espermina	29	90	100	71	73
Média	80	94	91	75	70

Observando a tabela anterior, verifica-se que os ácidos que apresentam melhores resultados médios são o HClO₄ 0,6M e o TCA 5%. Este último, com a sua acção desproteinizante, é muito citado na literatura para aplicação a matrizes cárneas em alternativa ao HClO₄ (Moret *et al.*, 1996b). Comparando os resultados dos dois ácidos anteriores, só se encontraram diferenças em relação à capacidade extractiva para a triptamina, com resultados inferiores para o HClO₄. Por apresentar resultados mais constantes optou-se pelo TCA a 5%.

Extracção líquido / líquido

Com o objectivo de purificar o extracto obtido (TCA 5%) foram testados três solventes orgânicos e um reagente de par-iónico:

- 1. Éter dietílico
- 2. Butanol / água
- 3. Butanol / clorofórmio
- 4. BEHPA / clorofórmio
- 5. Sem extracção líquido/líquido

Protocolo experimental

1. A 1 ml de extracto ácido adicionaram-se 500 µl de éter dietílico e homogeneizou-se em vortex durante 1 min. Rejeitou-se a fase inferior (etérea) e repetiu-se o processo de limpeza mais duas vezes com 500 µl de éter dietílico de cada vez. Evaporou-se o excesso de éter dietílico com N_2 durante 10 min. Retiraram-se 400 µl do extracto obtido e procedeu-se à derivatização como descrito anteriormente.
2. A 5 ml de extracto ácido adicionaram-se 1 ml de NaOH 5M e saturou-se o meio com Na_2CO_3 anidro. Em seguida, adicionaram-se 3 ml de butanol (BuOH) saturado em água, homogeneizou-se em vortex durante 1 min. e recuperou-se o sobrenadante (BuOH). Repetiu-se o processo anterior com mais 3 ml de BuOH saturado. Adicionaram-se aos sobrenadantes recuperados 2,5 ml de HCl 0,1 M, homogeneizou-se em vortex durante 1 min. e recuperou-se o sobrenadante (HCl). Repetiu-se o processo anterior com mais 2,5 ml de HCl 0,1 M. Retiraram-se 400 µl do extracto obtido e procedeu-se à derivatização como descrito anteriormente.
3. A 5 ml de extracto ácido adicionaram-se 1 ml de NaOH 5M e saturou-se o meio com Na_2CO_3 anidro. Em seguida adicionaram-se 5 ml de BuOH/clorofórmio (1:1), homogeneizou-se em vortex durante 1 min. e recuperou-se o sobrenadante (BuOH/clorofórmio). Repetiu-se o processo anterior com mais 5 ml de BuOH/clorofórmio. Retiraram-se 800 µl do extracto obtido e adicionaram-se duas gotas de HCl 0,1 M antes de evaporar à secura com N_2 . Recuperou-se com 400 µl de HCl 0,1 M e procedeu-se à derivatização como descrito anteriormente.
4. Retiraram-se 2 ml de extracto ácido, acertou-se o pH a 7,4 e completou-se o volume até 3 ml com tampão fosfato pH 7,4 (0,2 M). Adicionaram-se 2 ml da solução 0,1 M de BEHPA em clorofórmio, homogeneizou-se durante 5 min. e centrifugou-se a 3500 rpm durante 5 min. Retirou-se a fase inferior (clorofórmio) à qual se adicionaram 2 ml de HCl 0,1 M, homogeneizou-se e centrifugou-se como anteriormente. Da fase superior (HCl) retiraram-se 400 µl e procedeu-se à derivatização como descrito anteriormente.
5. Retiraram-se 400 µl do extracto ácido e procedeu-se à derivatização como descrito anteriormente sem efectuar qualquer extracção líquido / líquido.

Os cromatogramas resultantes de cada um dos procedimentos anteriores foram analisados, por forma a detectar substâncias interferentes, assim como as áreas e relação de áreas (amina/PI) obtidas para cada amina.

Os cromatogramas dos processos 2 e 3 apresentaram dois picos interferentes com tempos de retenção coincidentes com a cadaverina e a histamina, e que se confirmou não se tratarem de aminas, através do espectro de UV e da inexistência de fluorescência no comprimento de onda estabelecido. Para além disso, e de acordo com Moret e Conte (1996), a saturação do meio com Na_2CO_3 utilizada nos processos anteriores, apesar de necessária para que as aminas passem totalmente para a fase orgânica, é difícil de padronizar, já que, quantidades diferentes de solutos presentes em diferentes matrizes podem influenciar a solubilidade deste sal e, conseqüentemente, o pH do meio após saturação. Para além disto, a solubilidade do Na_2CO_3 é fortemente influenciada pela temperatura e diferenças de 5°C originam variações de pH de 0,5 unidades. Para evitar estes problemas, os autores anteriores sugerem a utilização de cloreto de sódio (NaCl) por ser um sal que não influencia o pH. O Na_2CO_3 , a ser utilizado, obriga a uma verificação e a um ajuste do pH. Pelas dificuldades referidas em relação aos dois processos em questão optou-se pela sua rejeição.

A tabela 2.4 mostra os resultados da relação de áreas em percentagem das aminas doseadas para os processos 1, 4 e 5.

Tabela 2.4 – Resultados das relações de áreas (%) obtidas para cada processo de extracção líquido / líquido.

Amina	Amina/IS (%)		
	1	4	5
Triptamina	100	62	72
β -Feniletilamina	100	70	32
Putrescina	99	98	94
Cadaverina	100	100	93
Histamina	92	92	83
Tiramina	100	90	95
Espermidina	67	100	99
Espermina	52	84	100
Média	89	87	83

O processo 4 (BEHPA) apesar de mostrar relações de áreas ligeiramente inferiores ao processo 1 apresenta um cromatograma mais limpo, com menos impurezas, especialmente na zona das aminas minoritárias como a triptamina, a β -feniletilamina, a espermidina e a espermina. O processo 5 (sem extracção líquido / líquido), apesar de na prática permitir um ganho de tempo, mostrou os piores resultados para a β -feniletilamina. Desta forma, optou-se pelo processo de extracção líquido / líquido com o reagente de par-iónico BEHPA.

2.3.1.5.2 – Condições de derivatização

Quanto às condições de derivatização, pretendeu-se estudar e otimizar alguns parâmetros com influência na reprodutibilidade dos resultados como o pH, a temperatura e o tempo de derivatização, a neutralização do excesso de derivatizante e a re-extracção dos derivados para um solvente orgânico.

pH de derivatização

O controlo do pH no momento da derivatização é absolutamente essencial para a obtenção de resultados reprodutíveis. A escolha do pH óptimo está relacionada com as aminas a determinar, já que, por apresentarem diferentes estruturas químicas, o comportamento destas varia com o pH. Deste modo, o pH escolhido deve representar uma situação de compromisso que permita a obtenção de resultados satisfatórios para a maioria das aminas a quantificar.

Moret e Conte (1996), verificaram percentagens de recuperação máximas para a generalidade das aminas a pH 11,5 e acima deste valor uma quebra drástica da recuperação da tiramina, cujos resultados óptimos são obtidos a pH 10,0. No entanto, com este valor de pH as recuperações obtidas para a putrescina, cadaverina, histamina, espermidina e espermina foram muito baixas.

Protocolo experimental

De um extracto de HCl 0,1 M obtido na extracção com BEHPA utilizaram-se quatro tomas de 400 μ l. A cada uma destas adicionou-se 1 ml de solução saturada de Na_2CO_3 e ajustou-se o pH a 12,0, 11,5, 11,0 e 10,5 respectivamente, seguindo-se o processo de derivatização como descrito anteriormente. A saturação do meio com Na_2CO_3 é importante para reduzir a solubilidade das aminas na fase aquosa (Arlorio *et al.*, 1999).

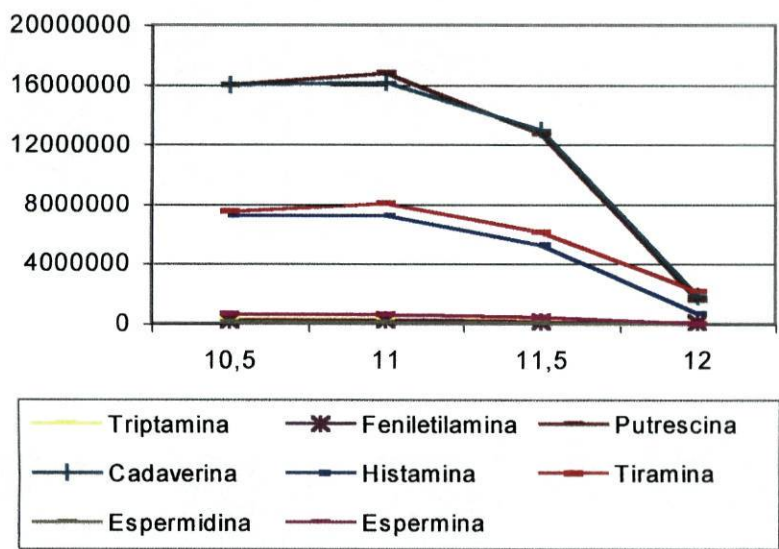
A tabela 2.5 apresenta os resultados da relação de áreas em percentagem das aminas doseadas para cada um dos valores de pH testados.

Tabela 2.5 – Resultados das relações de áreas (%) obtidas para cada valor de pH testado.

Amina	Amina/IS (%)			
	pH 10,5	pH 11,0	pH 11,5	pH 12,0
Triptamina	67	62	69	100
β-Feniletilamina	41	43	34	100
Putrescina	100	97	96	61
Cadaverina	100	93	98	72
Histamina	100	92	88	61
Tiramina	56	56	55	100
Espermidina	100	89	89	35
Espermina	100	86	77	21
Média	83	77	76	70

Da observação dos resultados anteriores não se verificam grandes diferenças com valores de pH entre 10,5 e 11,5, parecendo evidente que os piores resultados são obtidos a pH 12,0, especialmente para a espermidina e espermina que têm estruturas químicas semelhantes. Os resultados da tabela anterior não são muito conclusivos, no entanto, observando a figura 2.2, que representa em maior pormenor a área obtida para cada uma das aminas com cada um dos valores de pH estudados, verifica-se que a pH 11,0 se obtêm as maiores áreas para a generalidade das aminas, tendo sido este o valor de pH seleccionado para derivatização dos compostos.

Figura 2.2- Áreas (uAU) das aminas para cada um dos valores de pH testados.



Temperatura e tempo de derivatização

A temperatura e o tempo de derivatização, tal como o pH, condicionam a eficiência do processo e consequentemente as recuperações obtidas para cada uma das aminas. A temperatura condiciona a velocidade da reacção entre as aminas e o derivatizante e a estabilidade dos derivados formados. Geralmente são escolhidas temperaturas mais elevadas por permitirem um menor tempo de reacção, no entanto, é importante chegar a um compromisso entre estes dois parâmetros de modo a obter os melhores resultados para a maioria das aminas. De acordo com Maijala e Eerola (1993), o tempo de reacção pode ser encurtado significativamente através do aumento da temperatura para valores entre 40-70°C.

As temperaturas e os tempos de derivatização testados neste trabalho estão representados na tabela 2.6.

Tabela 2.6 - Temperaturas e tempos de derivatização testados.

Temperatura	Tempo
60°C	5 min.
	10 min.
	15 min.
40°C	30 min.
	45 min.
	60 min.

Protocolo experimental

De um extracto de HCl 0,1 M retiraram-se seis tomas de 400 µl. Após adicção de 1 ml de solução saturada de Na₂CO₃ ajustou-se o pH a 11,0 e adicionou-se 1 ml de derivatizante (7,5 mg/ml de acetona). Cada uma das tomas foi colocada em banho-maria e ao abrigo da luz a uma das temperaturas e durante um dos tempos referidos na tabela anterior.

A tabela 2.7 mostra os resultados, da relação de áreas em percentagem, das aminas doseadas para cada uma das relações temperatura/tempo testadas.

Tabela 2.7 - Resultados das relações de áreas (%) obtidas para cada relação de temperatura/ /tempo testada.

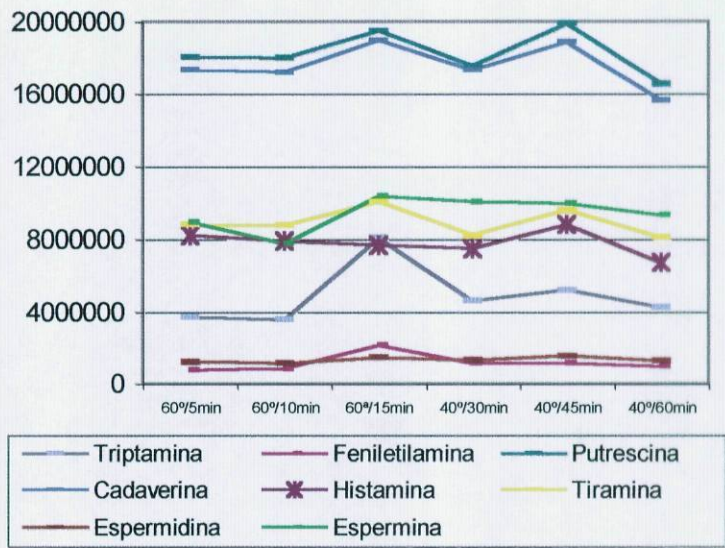
Amina	Amina/IS (%)					
	60°/ 5min	60°/ 10min	60°/15min	40°/ 30min	40°/ 45min.	40°/ 60min.
Triptamina	76	73	71	94	100	87
β -Feniletilamina	68	73	64	100	96	84
Putrescina	97	99	97	100	99	100
Cadaverina	95	96	94	100	95	96
Histamina	100	98	99	96	99	91
Tiramina	98	99	98	96	98	100
Espermidina	86	80	85	93	100	88
Espermina	87	75	100	98	91	90
Média	88	87	89	97	97	92

Vallé e Malle (1997), otimizaram o tempo de derivatização a 60°C verificando que 5 minutos era o tempo suficiente para a obtenção de recuperações máximas para a maioria das aminas doseadas.

De uma maneira geral, os resultados obtidos com as duas temperaturas estudadas neste trabalho são muito constantes, verificando-se uma diferença mais acentuada apenas nos resultados da β -feniletilamina que se apresentam piores a 60°C com qualquer um dos tempos estudados.

Apesar das médias das relações amina/IS serem superiores a 40°C e especialmente durante 45 min., observando a figura 2.3, que representa em pormenor as áreas obtidas para cada uma das relações temperatura / tempo, verifica-se que os melhores resultados são obtidos a 60° / 15 min e a 40°C / 45 min. Por motivos de ordem prática, optou-se por seleccionar a relação 60°/ 15 min, já que permite a obtenção de resultados reprodutíveis num mais curto espaço de tempo.

Figura 2.3 - Áreas (uAU) das amins para cada um dos valores de temperatura / tempo testados.



Concentração do derivatizante

A concentração do reagente derivatizante também foi testada, por forma a ser definida uma concentração suficiente para a derivatização dos compostos em análise, evitando concentrações excessivas, responsáveis pelo aparecimento de picos interferentes nos cromatogramas.

Foram testadas três concentrações de cloreto de dansilo: 5 mg/ml; 7,5 mg/ml e 10 mg/ml.

Protocolo experimental

Cada uma das concentrações a testar de cloreto de dansilo em acetona foi adicionada a uma toma de extracto de HCl 0,1 M saturado com Na₂CO₃ e a pH 11,0. Após homogeneização em vortex durante 30 segundos, as três tomas foram colocadas em banho-maria a 60°/15 min ao abrigo da luz.

A tabela 2.8 mostra os resultados, da relação de áreas em percentagem, das amins doseadas para cada uma das concentrações de cloreto de dansilo testadas.

Tabela 2.8 - Resultados das relações de áreas (%) obtidas para cada uma das concentrações de cloreto de dansilo testadas.

Amina	Amina/IS (%)		
	5 mg/ml	7,5 mg/ml	10 mg/ml
Triptamina	100	90	98
β -Feniletilamina	100	88	97
Putrescina	82	100	100
Cadaverina	91	100	100
Histamina	37	99	100
Tiramina	90	100	100
Espermidina	69	92	100
Espermina	58	90	100
Média	78	95	99

Os resultados anteriores mostram que o aumento da concentração de cloreto de dansilo até 10 mg/ml leva a um aumento da média da relação de áreas entre amina e IS, no entanto, não se verificam grandes diferenças entre a concentração de 7,5 mg/ml e de 10 mg/ml. Desta forma, optou-se por seleccionar a concentração de 7,5 mg/ml que permite, para resultados igualmente bons, poupar reagente derivatizante.

Vallé e Malle (1997) também optimizaram a concentração de cloreto de dansilo adicionado, testando concentrações de 3 a 20 mg/ml em acetona. Verificaram recuperações máximas a 6 mg/ml para a putrescina, a 10 mg/ml para a espermidina e espermina e entre 15-20 mg/ml para a cadaverina e tiramina.

Neutralização do derivatizante

Após derivatização, é comum proceder-se à neutralização do excesso de derivatizante por forma a parar a reacção e desse modo prolongar a estabilidade dos derivados. Normalmente, utiliza-se para este fim uma solução aquosa de L-prolina numa concentração de 100 mg/ml (Duflos *et al.*, 1999; Malle e Vallé, 1996) ou amónia (Eerola *et al.*, 1993).

Neste trabalho, a eficiência da neutralização do excesso de derivatizante foi testada com prolina e com amónia.

Protocolo experimental

Depois de decorrido o tempo de derivatização (15 min.) à temperatura definida anteriormente (60°C) adicionaram-se imediatamente, a cada uma de duas tomas recém derivatizadas, 100 µl de L-prolina (100 mg/ml) e 100 µl de amónia. A reacção de neutralização ocorreu ao abrigo da luz durante 15 minutos.

A tabela 2.9 mostra os resultados, da relação de áreas em percentagem, das aminas doseadas quando se procedeu à neutralização do derivatizante com prolina e com amónia.

Tabela 2.9 - Resultados das relações de áreas (%) obtidas com prolina e com amónia.

Amina	Amina/IS (%)	
	prolina	amónia
Triptamina	100	98
β-Feniletilamina	100	96
Putrescina	99	100
Cadaverina	100	100
Histamina	100	99
Tiramina	99	100
Espermidina	100	93
Espermina	99	100
Média	100	98

Observando a tabela anterior não se verificam grandes diferenças nos resultados obtidos entre a utilização de prolina e amónia. No entanto, com a prolina os resultados são mais constantes e sempre superiores a 98 % o que nos fez optar pela utilização desta para a neutralização do excesso de derivatizante.

Vallé e Malle (1997) testaram ainda o tempo e a temperatura de neutralização com L-prolina e verificaram que a 60°C o tempo pode ser reduzido para 4 min.. No entanto, os melhores resultados foram obtidos a 20°C durante 15 min. Estes autores verificaram que a utilização de 100 µl de prolina é mais que suficiente para neutralizar o excesso de derivatizante e que um teor inferior a 20 µl seria suficiente.

Extracção de derivados dansilo

Depois da derivatização, as aminas devem ser extraídas para uma fase orgânica, de modo a obter um extracto final compatível com o sistema cromatográfico. Na literatura são referidos

alguns solventes orgânicos para esse fim como, o tolueno (Price *et al.*, 1992; Malle e Vallé, 1996; Vallé e Malle, 1997; Duflos *et al.*, 1999), o acetonitrilo (Vallé e Malle, 1997), o éter etílico (Hornero-Méndez e Garrido-Fernández, 1994) ou o éter dietílico (Naguib *et al.*, 1995).

Para extrair as aminas derivatizadas testaram-se neste trabalho o tolueno e o éter etílico.

Protocolo experimental

Depois da reacção entre o excesso de derivatizante e a prolina adicionaram-se a cada uma de duas tomas 1,5 ml de tolueno e 1,5 ml de éter etílico.

Após homogeneização em vortex durante 1 min. colocou-se o tubo com tolueno a temperaturas de congelação durante alguns minutos para congelação da fase aquosa e facilitar a separação de fases. A fase orgânica (sobrenadante) foi retirada e evaporada à secura através de uma corrente de N₂.

Após agitação do tubo com éter etílico em vortex durante 1 min., retirou-se o sobrenadante (fase etérea) que foi evaporado à secura através de uma corrente de N₂.

Os derivados dos dois ensaios foram recuperados, após evaporação, com 300 µl de acetonitrilo (com agitação em vortex) e após centrifugação a 13000 rpm durante 5 min. armazenados a -20°C até ao momento da quantificação.

A tabela 2.10 mostra os resultados da relação de áreas em percentagem das aminas doseadas quando se procedeu à extracção dos derivados com tolueno e com éter etílico.

Tabela 2.10 - Resultados das relações de áreas (%) obtidas com tolueno e com éter etílico.

Amina	Amina/IS (%)	
	tolueno	éter etílico
Triptamina	93	100
β-Feniletilamina	65	100
Putrescina	100	93
Cadaverina	100	94
Histamina	93	100
Tiramina	97	100
Espermidina	100	87
Espermina	100	9
Média	93	85

Os resultados obtidos com tolueno e com éter etílico são muito semelhantes. No entanto, a área da espermina obtida com éter etílico foi muito baixa, o que nos fez optar pela utilização de tolueno na extracção dos derivados.

Estabilidade dos derivados

A estabilidade dos derivados foi testada através da introdução de um antioxidante, 3,3'-ácido tiodipropiónico (TDPA) a 0,2% ao TCA a 5% antes da extracção.

Os resultados obtidos não revelaram diferenças de áreas com a presença deste antioxidante ao fim de 48 h a -20°C. Os derivados, mesmo sem TDPA, mantiveram-se estáveis à temperatura ambiente durante 24 h, o que permitiu a utilização de um sistema de injeção automático aquando da análise das amostras.

2.3.1.6 – Protocolo seleccionado

O quadro 2.3 resume o protocolo seleccionado neste trabalho para a quantificação de aminas biogénicas e poliaminas naturais por HPLC, após optimização das condições cromatográficas de extracção e derivatização.

Quadro 2.3 – Protocolo seleccionado para a quantificação de aminas por HPLC.

Extracção	
Amostras	2,5 g
Sólido / líquido	2 vezes 12,5 ml de TCA 5%
Líquido / líquido	BEHPA 0,1 M / HCl 0,1 M
Derivatização	
pH	Alcalinização a pH 11,0
Concentração	Cloreto de dansilo (7,5 mg / ml em acetona)
Tempo	15 min a 60°C
Neutralização de excesso de derivatizante	100 µl de Prolina (100 mg / ml)
Extracção dos derivados	1,5 ml de Tolueno
Evaporação à secura	
Recuperação	Sim
	300 µl de Acetonitrilo
Armazenamento	
	Congelação (-20°C)
Cromatografia	
Coluna	Kromasil 100 C18 5µm (25cm x 0,4cm)
Eluição	Eluente A = ácido fosfórico 0,5 mM Eluente B = 50% acetonitrilo / 50% metanol
Detecção	UV (254 nm) Fluorescência (Ex. 252 nm Em. 500 nm)
Tempo total	40 minutos
Gradiente	Ver tabela 2.1
Integração	
	Área do pico

2.3.1.7 – Validação do método

2.3.1.7.1 - Linearidade

Para a quantificação dos compostos em estudo empregou-se o método do padrão interno, tendo sido adicionado um teor de 25 µg/ml de 1,7-diaminoheptano a cada uma das misturas padrão e amostras.

Para a construção das curvas de calibração utilizaram-se 5 misturas de padrões obtidas a partir de diluições de uma mistura padrão mãe que, de acordo com a bibliografia, continha cada amina numa concentração ligeiramente superior à máxima encontrada em enchidos.

A constituição das misturas de padrões é apresentada no quadro 2.4.

Quadro 2.4 – Constituição das misturas de padrões (µg/ml) utilizadas para obtenção das curvas de calibração.

	P1	P2	P3	P4	P5
Triptamina	0,30	1,00	3,00	6,00	10,00
β-Feniletilamina	0,12	0,38	1,15	2,31	3,85
Putrescina	1,50	5,00	15,00	30,00	50,00
Cadaverina	1,50	5,00	15,00	30,00	50,00
Histamina	0,90	3,00	9,00	18,00	30,00
Tiramina	1,20	4,00	12,00	24,00	40,00
Espermidina	0,15	0,50	1,50	3,00	5,00
Espermina	0,90	3,00	9,00	18,00	30,00

As soluções padrão foram preparadas em água purificada, refrigeradas a 4°C e mantidas ao abrigo da luz.

Estas soluções foram sujeitas ao protocolo extractivo seleccionado e apresentado no quadro 2.3.

De cada mistura de padrões foram efectuadas três injeções. O coeficiente de variação dos triplicados foi sempre inferior a 3%.

As curvas de calibração e respectivas equações da recta para cada composto em análise apresentam-se nas figuras 2.4 a 2.11. As figuras representam as relações de áreas amina/IS obtidas para cada concentração (µg/ml) de padrão.

Figura 2.4 – Curva de calibração da triptamina em fluorescência.

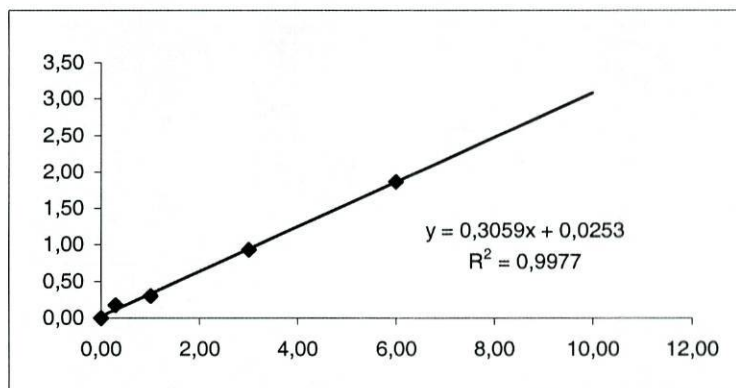


Figura 2.5 – Curva de calibração da β -feniletilamina em fluorescência.

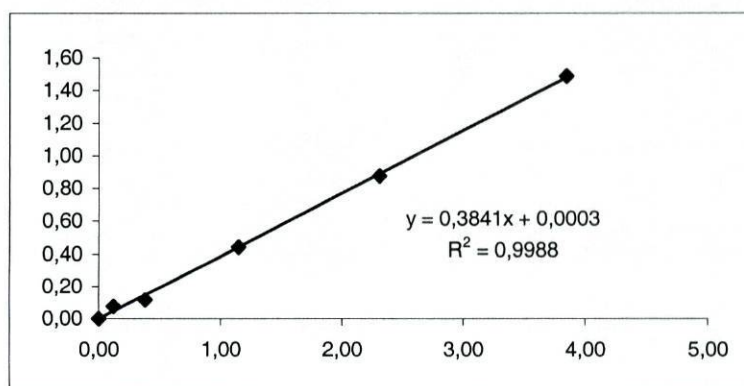


Figura 2.6 – Curva de calibração da putrescina em UV.

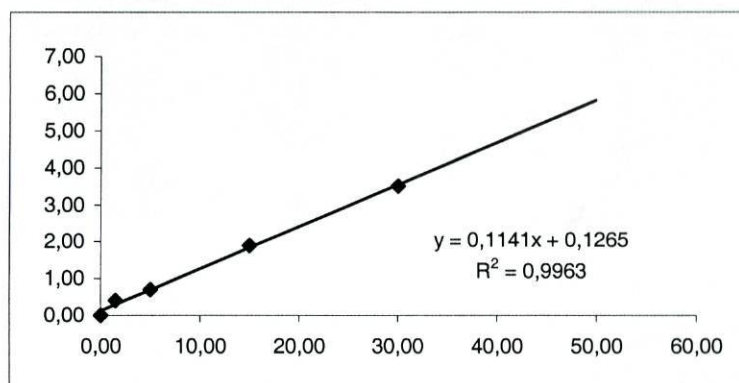


Figura 2.7 – Curva de calibração da cadaverina em UV.

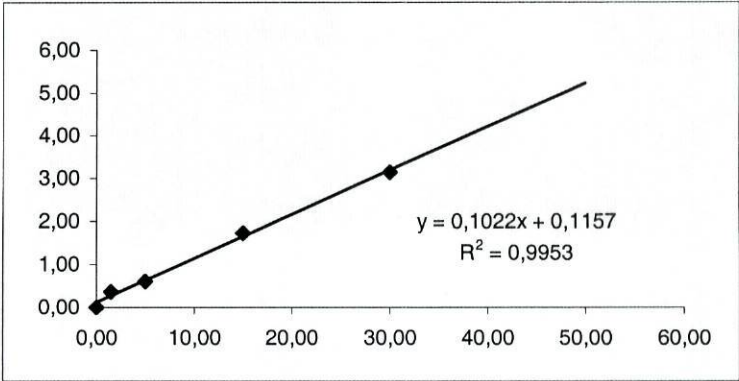


Figura 2.8 – Curva de calibração da histamina em UV.

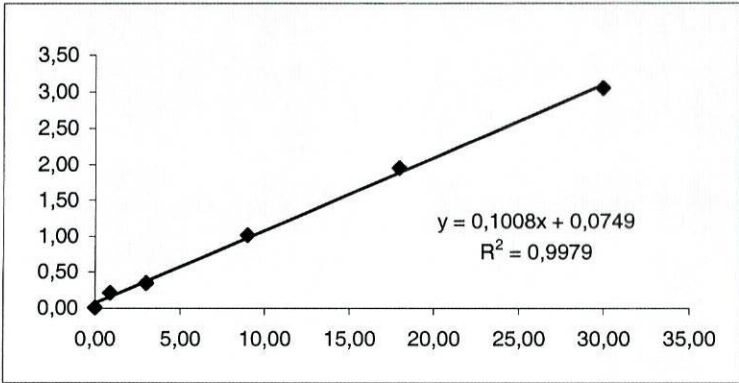


Figura 2.9 – Curva de calibração de tiramina em UV.

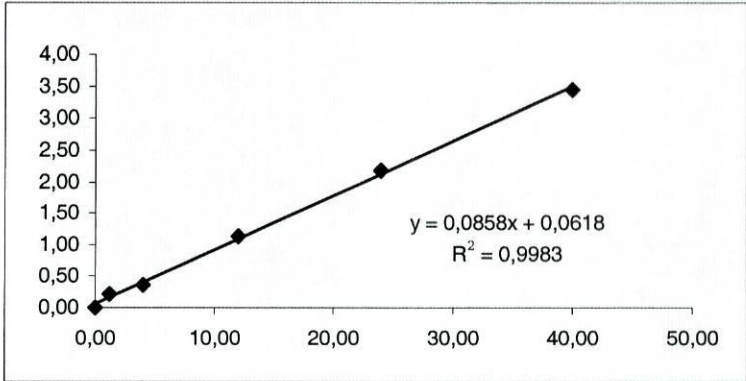


Figura 2.10 – Curva de calibração da espermidina em UV.

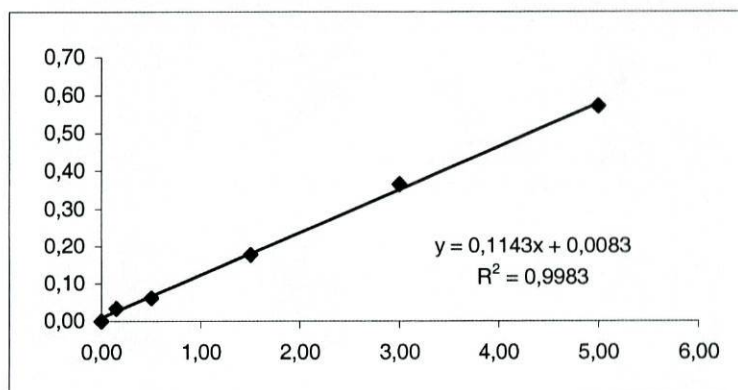
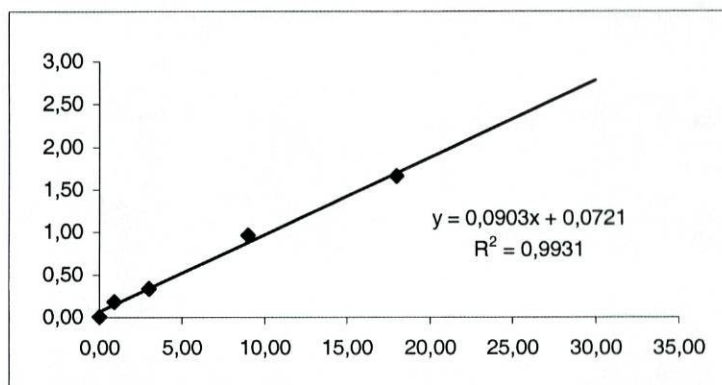


Figura 2.11 – Curva de calibração da espermina em UV.



Os coeficientes de correlação para todas as curvas de calibração de padrões excederam invariavelmente 0,99.

Nas condições de ensaio, foi obtida uma relação linear entre as concentração da triptamina e da β -feniletilamina e a resposta do detector fluorimétrico, e entre as restantes aminas e a absorvância no UV (254 nm).

2.3.1.7.2 – Limites de detecção e de quantificação

O limite de detecção foi calculado como sendo a concentração correspondente a três vezes o desvio-padrão do ruído de fundo.

O limite de quantificação foi calculado após injeção de sucessivas diluições de uma amostra.

A tabela 2.11 resume a informação dada anteriormente, incluindo os tempos de retenção obtidos, limites de linearidade, limites de detecção e limites de quantificação dos compostos em análise.

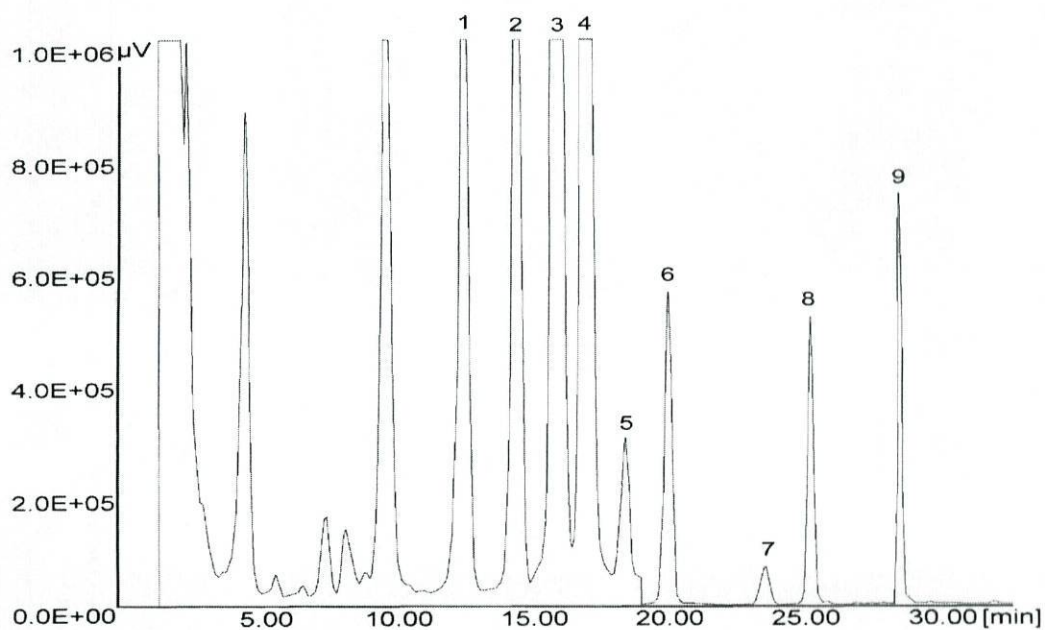
Tabela 2.11 – Tempos de retenção (t_r), limites de linearidade, detecção e quantificação dos compostos em análise.

Composto	t_r (min.)	Limites de		
		Linearidade ($\mu\text{g/ml}$)	Deteção ($\mu\text{g/100g}$)	Quantificação ($\mu\text{g/100g}$)
Triptamina	12,58	0,30 – 6,00	0,15	1,82
β -feniletilamina	14,67	0,12 – 3,85	0,10	0,96
Putrescina	16,11	1,50 – 30,00	0,07	2,94
Cadaverina	17,19	1,50 – 30,00	0,07	2,33
Histamina	18,57	0,90 – 30,00	0,42	7,60
Tiramina	23,75	1,20 – 40,00	0,11	15,92
Espermidina	25,39	0,15 – 5,00	7,38	10,42
Espermina	28,63	0,90 – 18,00	14,37	45,92

As figuras 2.12 e 2.13 apresentam os cromatogramas dos padrões de aminas estudadas e obtidos nas condições descritas.

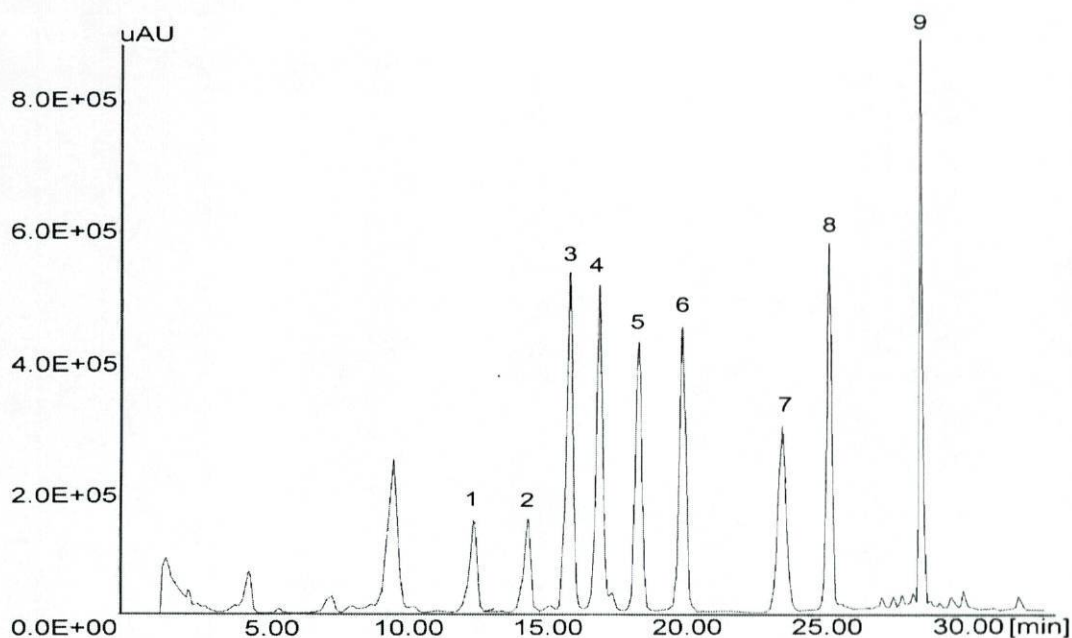
As poliaminas, espermina e espermidina, apresentaram os limites de detecção mais elevados (14,37 e 7,38 $\mu\text{g/100g}$ respectivamente). Estes teores reflectiram-se também nos limites de quantificação com valores de 45,92 e 10,42 $\mu\text{g/100g}$ para a espermina e espermidina respectivamente. Apesar da histamina e da tiramina não apresentarem limites de detecção muito elevados, apresentam limites de quantificação de 7,60 e 15,92 $\mu\text{g/100g}$, respectivamente. Estes valores sugerem a possibilidade da existência de compostos interferentes com o mesmo tempo de retenção destas aminas.

Figura 2.12 – Cromatograma dos padrões das aminos doseadas e detectadas por fluorescência.



1 – Triptamina; 2 - β -Feniletilamina; 3 – Putrescina; 4 – Cadaverina; 5 – Histamina; 6 – IS; 7 – Tiramina; 8 – Espermidina; 9 – Espermina.

Figura 2.13 – Cromatograma dos padrões das aminos doseadas e detectadas em UV (254 nm).



1 – Triptamina; 2 - β -Feniletilamina; 3 – Putrescina; 4 – Cadaverina; 5 – Histamina; 6 – IS; 7 – Tiramina; 8 – Espermidina; 9 – Espermina.

2.3.1.7.3 – Precisão da extracção

Para o estudo da precisão realizaram-se 5 determinações sobre a mesma amostra de enchido e efectuaram-se duas injeções de cada. Calcularam-se o valor da média, desvio-padrão e coeficiente de variação para cada uma das aminas presentes na referida amostra (tabela 2.12).

Tabela 2.12 – Média, desvio-padrão e coeficiente de variação dos compostos estudados.

Composto	Média (n=5) (mg/100g)	Desvio-padrão (mg/100g)	CV %
Triptamina	0,937	0,033	4
β -feniletilamina	0,292	0,007	2
Putrescina	12,592	0,448	4
Cadaverina	6,314	0,198	3
Histamina	5,996	0,139	2
Tiramina	10,022	0,119	1
Espermidina	0,068	0,002	3
Espermina	0,502	0,022	4

Os coeficientes de variação obtidos foram sempre inferiores ou iguais a 4%.

2.3.1.7.4 – Recuperação

A determinação das percentagens de recuperação foi realizada pelo método das adições de padrão. Adicionaram-se ao enchido quantidades conhecidas dos compostos presentes na amostra tendo sido efectuadas três injeções para cada concentração. A partir da quantidade determinada de cada composto e do seu teor original, calcularam-se as respectivas percentagens de recuperação.

Os resultados obtidos encontram-se na tabela 2.13.

Tabela 2.13 – Recuperações das aminas presentes numa amostra de enchido em estudo após a adição de concentrações crescentes destes compostos.

Composto	Adição (mg/100g)	Concentração (mg/100g)		Recuperação (%)	
		Esperada	Detectada		Média
Triptamina	0,50	1,63	1,47	90,2	86
	1,00	2,13	1,79	84,0	
	1,50	2,63	2,22	84,4	
β -feniletilamina	0,19	0,76	0,66	86,8	86
	0,39	0,96	0,82	85,4	
	0,58	1,15	0,97	84,3	
Putrescina	5,00	15,98	15,87	99,3	99
	7,50	18,48	18,30	99,0	
	10,00	20,98	20,76	99,0	
Cadaverina	1,50	7,94	8,57	107,9	111
	3,00	9,44	10,41	110,3	
	4,50	10,94	12,62	115,4	
Histamina	1,50	9,78	8,75	89,5	88
	3,00	11,28	10,00	88,7	
	4,50	12,78	10,91	85,4	
Tiramina	2,00	11,84	11,48	97,0	97
	4,00	13,84	13,59	98,2	
	6,00	15,84	15,25	96,3	
Espermidina	0,25	0,26	0,23	88,5	87
	0,50	0,51	0,45	88,2	
	0,75	0,76	0,65	85,5	
Espermina	1,50	1,57	1,58	100,6	105
	3,00	3,07	3,38	110,1	
	4,50	4,57	4,79	104,8	

De uma maneira geral, os compostos que se encontram na amostra em menor concentração são aqueles que apresentam percentagens de recuperação mais baixas, como é o caso da triptamina (86%), β -feniletilamina (86%) e espermidina (87%). As percentagens de recuperação médias encontradas variaram entre 86% e 111%.

III – RESULTADOS E DISCUSSÃO

1 – PARÂMETROS INDICADORES DE ESTABILIDADE

1.1 – Actividade da água (a_w)

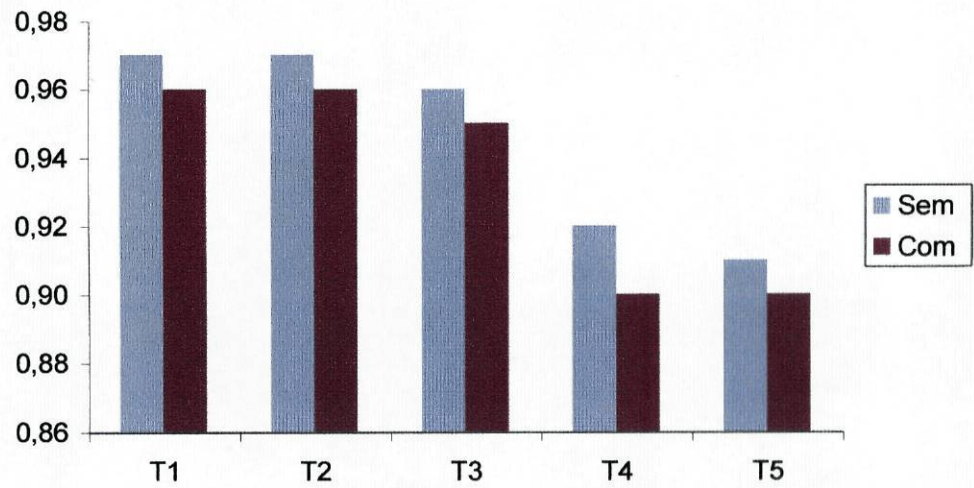
Os resultados médios da determinação da a_w nos diferentes tempos ao longo do fabrico e armazenamento das duas formulações de linguças são apresentados no quadro e na figura 3.1.

Uma vez que a determinação laboratorial deste parâmetro é muito demorada, sendo necessários, por vezes, períodos de algumas horas para obter uma medida fidedigna, esta medida foi realizada apenas em 2 repetições de cada fabrico e tempo, e não em 5 como nas restantes variáveis. Deste modo, não foi feita análise de variância aos resultados desta determinação.

Quadro 3.1 – Resultados médios da a_w (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	0,97± 0,02	0,97 ± 0,03	0,96 ± 0,05	0,92 ± 0,04	0,91 ± 0,06	0,95 ± 0,03
Com	0,96 ± 0,05	0,95 ± 0,03	0,95 ± 0,09	0,90 ± 0,07	0,90 ± 0,09	0,93 ± 0,03
Média	0,97 ± 0,01	0,97 ± 0,01	0,96 ± 0,01	0,91 ± 0,01	0,91 ± 0,01	

Figura 3.1 – Valores médios da determinação da actividade da água nos cinco tempos de fabrico / armazenamento analisados.



Como se pode verificar na figura 3.1, só no final do processo de secagem, entre os 10 dias de fabrico (T3) e os 35 dias considerados para o produto acabado (T4), é que ocorreu uma redução da a_w até valores considerados suficientes por Leistner *et al.* (1981) para assegurar a estabilidade das linguças com mistura acidificante / antioxidante ($0,90 \pm 0,07$). As linguças sem mistura atingiram valores de a_w de $0,92 \pm 0,04$ no final do mesmo período, que não são suficientes para assegurar a estabilidade dos produtos só com base na a_w . A desidratação que se verifica para estes produtos durante o período de armazenamento (entre T4 e T5) origina valores de a_w de $0,91 \pm 0,06$. Em termos médios, as linguças sem mistura apresentam valores de a_w superiores aos da linguça com mistura ($0,95 \pm 0,03$ contra $0,93 \pm 0,03$).

Os valores de a_w encontrados neste trabalho no produto final (T4) são ligeiramente superiores aos observados por Esteves *et al.* (1999) em linguças provenientes de produtores domésticos da região transmontana ($0,84 \pm 0,04$). Estes autores observaram amostras com valores de a_w consideravelmente mais reduzidos, que pode ser reflexo do tipo de fabrico artesanal a que são sujeitas, dado não haver qualquer controlo das condições de secagem e armazenamento. Patarata *et al.* (1998) observaram também, em linguças produzidas em laboratório, valores de a_w inferiores aos observados neste trabalho ($0,83 \pm 0,02$).

1.2 - pH

Os resultados médios do pH determinado nos diferentes tempos ao longo do fabrico e armazenamento das duas formulações de linguças são apresentados no quadro e na figura 3.2.

Quadro 3.2 – Resultados médios de pH (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	$5,86 \pm 0,02^{a1}$	$5,01 \pm 0,01^{b1}$	$4,98 \pm 0,04^{b1}$	$5,20 \pm 0,03^{c1}$	$5,25 \pm 0,03^{c1}$	$5,28 \pm 0,36$
Com	$5,49 \pm 0,13^{a2}$	$5,00 \pm 0,12^{b1}$	$4,91 \pm 0,10^{b1}$	$5,23 \pm 0,05^{c1}$	$5,25 \pm 0,17^{c1}$	$5,18 \pm 0,24$
Média	$5,73 \pm 0,26$	$5,01 \pm 0,08$	$4,95 \pm 0,08$	$5,22 \pm 0,04$	$5,25 \pm 0,11$	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

O pH tem um comportamento semelhante nas amostras dos dois ensaios ao longo do processo de fabrico e armazenamento das linguiças.

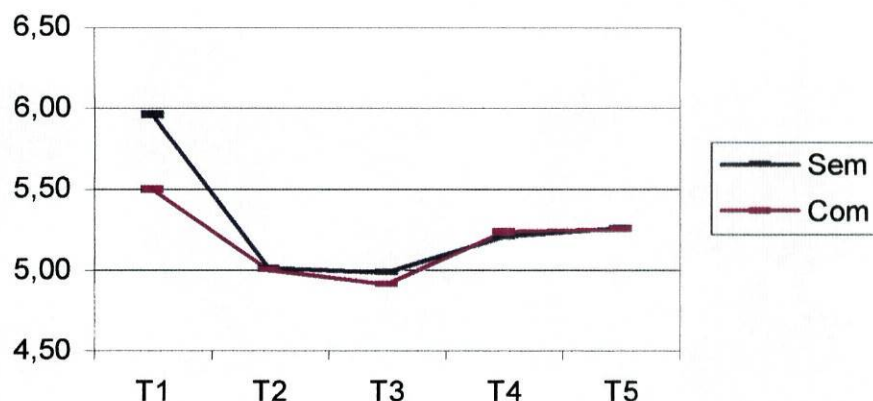
No período que corresponde ao fim da fumagem (T2) houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) de pH relativamente ao período anterior (T1). Este está certamente associado ao forte incremento na microflora láctica que ocorre durante o período de fermentação quando a temperatura atinge cerca de $32 \pm 3^\circ\text{C}$.

Os valores de pH mais baixos verificam-se em T3, aos 10 dias de fabrico, com um valor médio para os dois ensaios de $4,95 \pm 0,08$. De facto, nos últimos 25 dias de fabrico (entre T3 e T4) verificou-se um aumento de pH significativo ($p < 0,05$), prolongando-se de forma não significativa durante o período de armazenamento (entre T4 e T5). De acordo com Lucke (1985), este aumento de pH que, habitualmente, se observa no decurso da maturação e armazenamento dos enchidos é devido a mecanismos de proteólise, associados à libertação de amónia e outros compostos de carácter básico e à capacidade tampão do meio.

O efeito da adição da mistura acidificante / antioxidante faz-se sentir, significativamente ($p < 0,05$), após 3 dias de repouso da massa (T1), verificando-se um pH mais baixo para as amostras com mistura. Isto acontece devido à presença de GDL na mistura que é responsável pela rápida acidificação do meio, já que, de acordo com o fabricante, este aditivo origina um pH de 3,5 em solução aquosa a 10% ao fim de 30 minutos. Buncic *et al.* (1993), obtiveram resultados semelhantes, observando uma descida de pH significativa durante os primeiros dias de fabrico, mais pronunciada e rápida em amostras com GDL.

De T1 para T2 verifica-se uma descida média de pH de 0,85 unidades nas amostras sem mistura e de 0,49 nas amostras com mistura, o que faz com que, no final deste período, as amostras dos dois ensaios não se distingam. A queda de pH menos acentuada nas amostras com mistura, poderá ser explicada pela menor produção de ácido láctico pela microflora natural quando o pH do meio se encontra suficientemente baixo e mais próximo do pH óptimo para estes microrganismos. Após fumagem (T2) e até ao fim do tempo de armazenamento (T5), as amostras dos dois ensaios continuam sem se distinguirem, o que se verifica através da observação da figura 3.2. Em T5 atingem um valor igual a 5,25.

Figura 3.2 – Resultados médios de pH ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Segundo Leistner *et al.* (1981), um produto cárneo é considerado estável à temperatura ambiente quando apresenta um pH inferior a 5,0. Os produtos finais (T4), estudados neste trabalho, não são estáveis à temperatura ambiente só com base no pH, já que apresentam um pH superior ou igual a 5,2. No entanto, se considerarmos o efeito combinado do pH e da a_w , será suficiente que o produto apresente um pH inferior a 5,2, desde que a a_w apresente valores iguais ou inferiores a 0,95. Este critério aplica-se às linguiças sem mistura que apresentam um valor médio de a_w igual a 0,92 e de pH igual a 5,2 em T4.

O valor médio de pH encontrado neste trabalho nas linguiças das duas formulações (5,22) é inferior ao valor médio (5,37) observado por Esteves *et al.* (1999) em linguiça tradicional transmuntana para o produto acabado, o que pode ser justificado pela utilização neste trabalho de GDL, que é um forte condicionante do pH não utilizado pelos produtores domésticos.

1.3 – Humidade

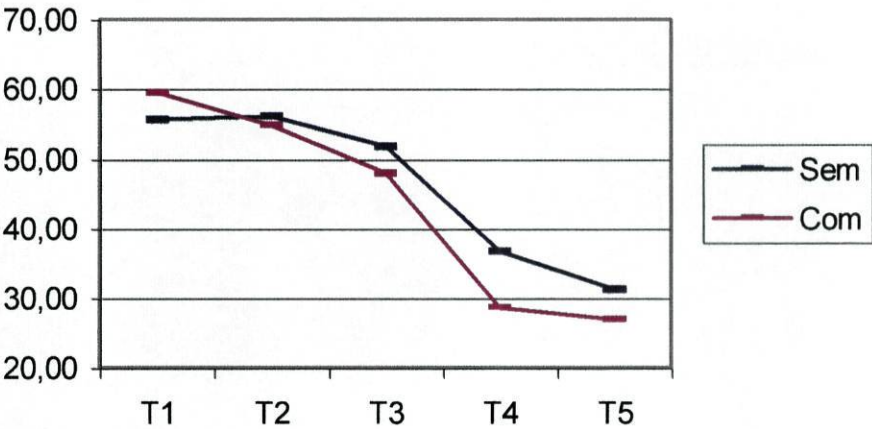
Os resultados médios da percentagem de humidade obtidos para os dois ensaios nos diferentes tempos de fabrico e armazenamento estudados são apresentados no quadro e na figura 3.3.

Quadro 3.3 – Resultados médios da % de humidade (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	55,7 ± 0,5 ^{a1}	56,1 ± 1,1 ^{a1}	51,9 ± 2,9 ^{b1}	36,8 ± 1,3 ^{c1}	31,3 ± 1,0 ^{d1}	46,4 ± 11,5
Com	59,5 ± 0,7 ^{a2}	54,9 ± 4,0 ^{a1}	48,1 ± 3,2 ^{b1}	28,6 ± 4,1 ^{c2}	26,9 ± 4,5 ^{c1}	43,6 ± 15,0
Média	57,6 ± 2,7	55,5 ± 0,8	50,0 ± 2,6	32,7 ± 5,8	29,1 ± 3,1	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.3 – Resultados médios da % de humidade ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



A perda de humidade, que se reflecte no aumento da matéria seca, ao longo do processo de fabrico das linguiças acompanha, com um comportamento semelhante, a diminuição da *a_w*. Esta relação é evidenciada, como seria de esperar, pela correlação (*R*² = 0,9267) altamente significativa entre estes dois parâmetros.

A percentagem de humidade diminui significativamente, e de forma mais acentuada, entre T3 (após 10 dias de fabrico) e T4 (produto final) para as 2 formulações estudadas. Esta diminuição atinge valores médios de 17,3%, e pode ser explicada pelo intervalo de tempo relativamente longo (25 dias) que decorreu entre estas duas determinações, correspondendo à fase final do processo de secagem. Assim, verifica-se ser este período do processo de maturação, que permite a obtenção de valores de *a_w* suficientemente baixos para garantir a estabilidade dos

produtos à temperatura ambiente. Apesar do efeito tempo se fazer sentir de forma mais marcada entre T3 e T4, também se verificam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre T2 (após fumagem) e T3. Estas diferenças reflectem o efeito do processo de secagem, que se inicia logo após a fumagem, quando os produtos são colocados em condições de temperatura e humidade controladas, por forma a perderem peso gradualmente.

A perda significativa de humidade de 5,5% observada durante o armazenamento (entre T4 e T5) nas linguiças sem mistura não era esperada. É normal que as linguiças não embaladas e armazenadas à temperatura ambiente desidratem. No entanto, todos os produtos aqui estudados foram armazenados nas condições em que normalmente são colocados no mercado pelas indústrias cárneas, embalados sob vácuo e colocados a temperaturas de refrigeração, o que não fazia esperar perdas de humidade muito acentuadas.

O efeito da adição da mistura faz-se sentir em T1, altura em que as amostras com mistura apresentaram uma percentagem de humidade superior ($59,5 \pm 0,7\%$ contra $55,7 \pm 0,5\%$). Após enchimento, entre T1 e T2, as amostras foram colocadas em varas durante 1h à temperatura ambiente e em seguida na câmara de secagem durante 24 h a temperatura e humidade controladas, para perderem o excesso de humidade que a tripa natural lhes confere e, deste modo, aumentar a eficácia do processo de fumagem. Durante este período, verificou-se uma perda de água muito mais acentuada nas amostras com mistura, o que fez com que em T2 o efeito da mistura não se fizesse sentir. Estas amostras apresentaram sempre, com excepção para T1, percentagens de humidade mais baixas, reflectindo uma maior perda de água durante todo o processo, o que levou a que o efeito da mistura se fizesse sentir no produto final (T4). Os valores médios de humidade obtidos para os 5 tempos estudados foram $46,4 \pm 11,5\%$ para as linguiças sem mistura e $43,6 \pm 15,0$ para as linguiças com mistura. Esta diferença reflecte-se nas características sensoriais dos produtos, especialmente relacionadas com a textura. A perda de humidade durante o processamento só é desejável até níveis que garantam a estabilidade dos produtos, já que, perdas de peso muito acentuadas originam produtos muito secos e com baixos rendimentos o que traz consequências económicas para os produtores.

2 – PARÂMETROS INDICADORES DE PROTEÓLISE

2.1 – Azoto Total (NT)

Os resultados médios do teor em azoto total, obtidos nos dois ensaios nos diferentes tempos de fabrico e armazenamento estudados, são apresentados no quadro e na figura 3.4.

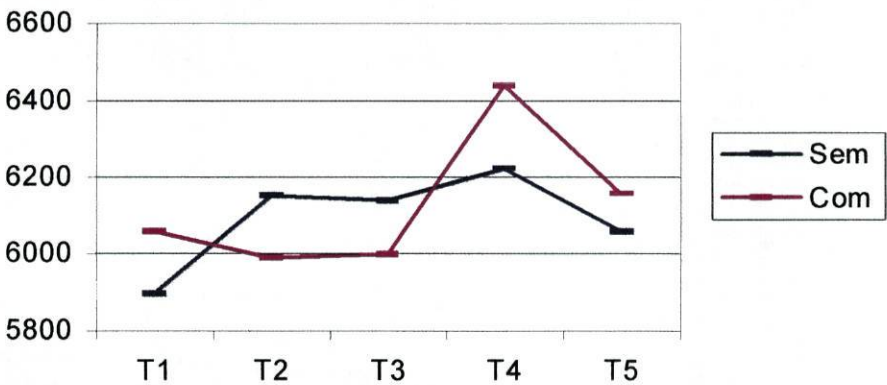
Quadro 3.4 – Resultados médios do teor em NT, expresso em mg de N/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	5894 ± 320	6149 ± 189	6135 ± 248	6218 ± 304	6055 ± 617	6090 ± 124
Com	6054 ± 261	5987 ± 974	5996 ± 408	6436 ± 426	6153 ± 284	6125 ± 189
Média	5974 ± 113	6068 ± 115	6066 ± 98	6327 ± 154	6104 ± 69	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.4 – Resultados médios do teor em NT, expresso em mg de N/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O teor em NT manteve-se constante ao longo do processo de fabrico / armazenamento das linguiças, apresentando valores médios de 6090 ± 124 mg de N /100g de matéria seca nas amostras sem mistura e de 6125 ± 189 mg de N/100g de matéria seca nas amostras em que a mistura acidificante / antioxidante foi adicionada.

O efeito da adição da mistura no teor de NT não se fez sentir em nenhum dos tempos estudados, o que era esperado porque as amostras dos dois ensaios foram processadas a partir da mesma matéria-prima de base.

Resultados semelhantes a estes foram obtidos por diversos autores nomeadamente De Masi *et al.* (1990) que verificaram um teor médio de NT de 5910 mg de N/100g de matéria seca e Bover-Cid *et al.* (1999b) que verificaram um teor de NT constante durante o processo de maturação e de cerca de 7200 ± 200 mg de N/100g de matéria seca.

2.2 – Azoto Não Proteico (NPN)

Os resultados médios do teor em azoto não proteico, obtidos para os dois ensaios nos diferentes tempos de fabrico e armazenamento estudados, são apresentados no quadro e na figura 3.5.

Quadro 3.5 – Resultados médios do teor em NPN expresso em mg de N/100g de matéria seca (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	570 ± 59^{a1}	611 ± 42^{ab1}	671 ± 39^{bc1}	716 ± 52^{c1}	681 ± 38^{bc1}	650 ± 58
Com	553 ± 108^1	600 ± 84^1	587 ± 52^2	607 ± 43^2	670 ± 92^1	603 ± 43
Média	562 ± 12	606 ± 8	629 ± 59	662 ± 77	676 ± 8	

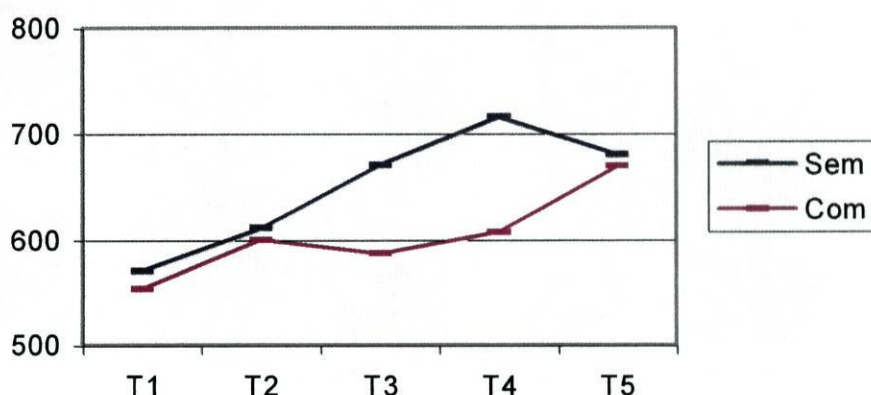
^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas ($P < 0,05$)

O efeito do tempo é pouco marcado ao longo do fabrico / armazenamento das linguças, verificando-se um aumento gradual do teor em NPN entre T1 e T4, e uma diminuição durante o armazenamento (entre T4 e T5) nas amostras sem mistura.

Nos produtos com mistura o NPN mantém-se relativamente constante apresentando aumentos não significativos ($p > 0,05$) de T1 para T2 de 47 mg de N/100g de matéria seca e de T4 para T5 de 63 mg de N/100g de matéria seca. O aumento de NPN é pouco marcado ao longo do tempo, o que se reflecte na obtenção de uma baixa correlação ($R^2 = 0,6236$) entre estas duas variáveis.

Figura 3.5 – Resultados médios do teor em NPN expresso em mg de N/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O efeito da mistura nos teores de NPN faz-se sentir de forma significativa ($p < 0,05$) em T3 (aos 10 dias de fabrico), altura em que as amostras sem mistura apresentam teores de 671 ± 39 mg de N/100g de matéria seca e as amostras com mistura teores de 587 ± 52 mg de N/100g de matéria seca, e em T4 (produto final) com teores de 716 ± 52 mg de N/100g de matéria seca e 607 ± 43 mg de N/100g de matéria seca, respectivamente.

Verifica-se um aumento do teor de NPN entre T1 e T4 correspondente a 1,25 vezes para as amostras sem mistura e de 1,1 vez para as amostras com mistura. No entanto, se considerarmos o aumento do teor de NPN, destas últimas, até ao fim do período de armazenamento (T5), este é de 1,21 vezes. Deste modo, e apesar do teor médio de NPN durante todo o processo ser mais elevado para as amostras sem mistura (650 ± 58 mg de N/100g de matéria seca) do que para as amostras com mistura (603 ± 43 mg de N/100g de matéria seca), no final do tempo de armazenamento os teores de NPN obtidos para os dois ensaios são semelhantes e iguais a 681 ± 38 mg de N/100g de matéria seca e 670 ± 92 mg de N/100g de matéria seca, respectivamente.

Os teores de NPN verificados neste trabalho são semelhantes aos observados por outros autores.

Astiasaran *et al.* (1990), observaram teores de NPN de 650 ± 53 mg de N/100g de matéria seca no momento da mistura e de 684 ± 80 mg de N/100g de matéria seca no produto acabado. DeMasi *et al.* (1990), observaram teores de NPN de 605 mg de N/100g de matéria seca no início do processo de maturação e de 624 mg de N/100g de matéria seca após fermentação.

Crespo *et al.* (1985), apesar de terem observado teores de NPN superiores, obtiveram um aumento de 1,35 vezes durante o período de maturação, não muito superior aos obtidos neste trabalho. Da mesma forma, Lois *et al.* (1987), estudando o efeito da introdução de açúcares na produção de NPN verificaram um aumento de 1,65 vezes nas amostras com açúcar e de 1,24 vezes nas amostras controle. Os autores anteriores consideraram estes resultados como uma consequência do pH inferior obtido nas amostras com açúcar, o que estimula a hidrólise das proteínas miofibrilares com produção de NPN. Ao contrário dos resultados destes autores, não se verificou uma produção de NPN mais elevada para as amostras com mistura, que continham lactose, assim como também não se verificaram valores de pH significativamente mais baixos, com exceção de T1, nestas amostras.

Dierick *et al.* (1974), observaram que o aumento de pH no final da maturação é uma consequência da actividade proteolítica e Bover-Cid *et al.* (1999b) encontraram uma correlação positiva ($p = 0,03$) entre o pH, na segunda fase da maturação (secagem) e o NPN. Os resultados obtidos neste trabalho não revelam a existência de uma correlação significativa entre o NPN e o pH. No entanto, o NPN evolui no mesmo sentido do pH durante a 2ª metade da fase de secagem (entre T3 e T4), nas amostras sem mistura, e durante o armazenamento (entre T4 e T5) nas amostras com mistura.

De acordo com Bover-Cid *et al.* (1999b) o aumento do NPN é uma consequência da actividade proteolítica da cultura iniciadora (“starter”) adicionada ou da microflora natural presente nos enchidos.

2.3 - Índice de Proteólise (IP)

De acordo com Astiasaran *et al.* (1990), o índice de proteólise pode ser considerado como a razão entre os teores de NPN e de NT.

Os resultados médios do IP em percentagem, obtidos para os dois ensaios nos diferentes tempos de fabrico e armazenamento estudados, são apresentados no quadro e na figura 3.6.

A percentagem de IP dos dois ensaios segue um perfil de evolução semelhante ao NPN.

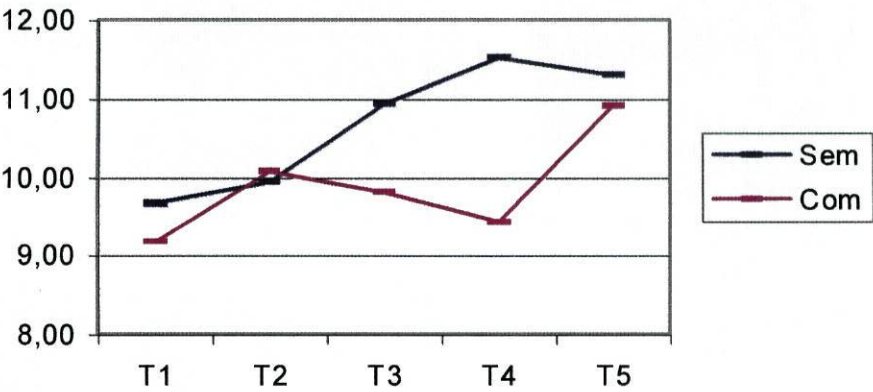
O efeito do tempo faz-se sentir na percentagem de IP, para as amostras sem mistura, através de um aumento gradual, sem que se verifiquem diferenças significativas ($p < 0,05$) entre dois tempos sucessivos, mas distinguindo significativamente, os dois primeiros tempos (T1 e T2) dos dois últimos (T4 e T5).

Quadro 3.6 – Resultados médios do IP em percentagem (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	9,67 ± 0,90 ^{al}	9,94 ± 0,45 ^{al}	10,93 ± 0,33 ^{abl}	11,52 ± 0,82 ^{bl}	11,30 ± 0,71 ^{bl}	10,67 ± 0,82
Com	9,17 ± 2,00 ^l	10,07 ± 0,67 ^l	9,81 ± 0,84 ^l	9,43 ± 0,46 ²	10,91 ± 1,68 ^l	9,88 ± 0,67
Média	9,42 ± 0,35	10,01 ± 0,09	10,37 ± 0,79	10,48 ± 1,48	11,11 ± 0,28	

a, b, c – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
 1, 2 - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.6 – Resultados médios do IP em percentagem ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



A percentagem de IP nas amostras com mistura manteve-se relativamente constante ao longo de todo o fabrico, apresentando aumentos não significativos ($p>0,05$) entre T1 e T2 e durante o período de armazenamento (entre T4 e T5). Em termos médios, estas amostras têm uma percentagem de IP inferior ($9,88 \pm 0,67$ % contra $10,67 \pm 0,82\%$) às amostras sem mistura, o que se justifica pela presença de uma microflora com actividade proteolítica menos intensa. Os resultados obtidos neste trabalho estão de acordo com os resultados apresentados por Astiasaran *et al.* (1990) que obtiveram um IP de $9,23 \pm 0,69$ % na fase de mistura e de $10,04 \pm 1,19\%$ no produto final. DeMasi *et al.* (1990), obtiveram uma percentagem de IP média de 10% durante o período de maturação dos enchidos. Dierick *et al.* (1974) referem a possibilidade de se encontrarem enchidos com uma percentagem de IP superior ou igual a 20%, no entanto, isto só

se verifica quando se adicionam culturas “starters” com grande actividade proteolítica e para períodos de secagem bastante mais longos (100 dias) do que o efectuado neste trabalho (25 dias).

2.4 – Aminoácidos livres (AA)

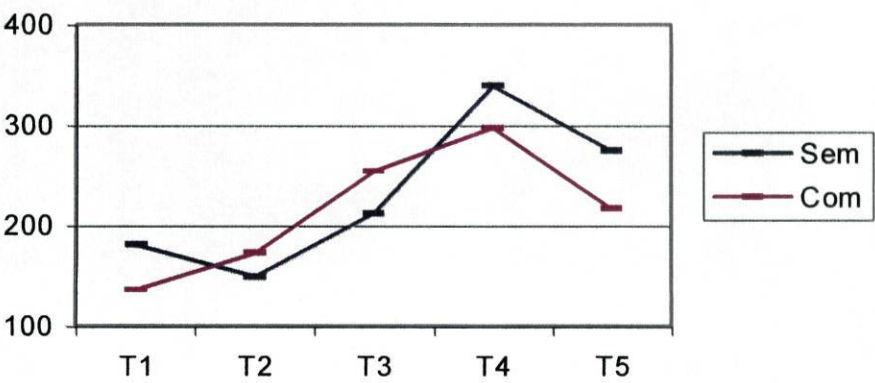
Os resultados médios do teor em aminoácidos livres, obtidos para os dois ensaios nos diferentes tempos de fabrico e armazenamento estudados, são apresentados no quadro e na figura 3.7.

Quadro 3.7 – Resultados médios do teor em AA expresso em mg de N/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	181 ± 20 ^{ab1}	149 ± 28 ^{a1}	212 ± 25 ^{b1}	339 ± 23 ^{c1}	275 ± 22 ^{d1}	231 ± 76
Com	136 ± 18 ^{a2}	173 ± 22 ^{ab1}	254 ± 49 ^{cd1}	297 ± 36 ^{c1}	217 ± 30 ^{bd2}	215 ± 64
Média	159 ± 32	161 ± 17	233 ± 30	318 ± 30	246 ± 41	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.7 – Resultados médios do teor em AA expresso em mg de N/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



De acordo com Stanculescu *et al.* (1970), o teor de AA evolui ao longo do processo de fabrico dos enchidos com o desenvolvimento da microflora.

Durante a fase de secagem e o armazenamento, os teores de AA seguem um perfil de evolução semelhante nas amostras das duas formulações. Entre T2 e T4 verifica-se um aumento acentuado do teor em AA de 190 mg de N/100g de matéria seca nas amostras sem mistura e de 124 mg de N/100g de matéria seca nas amostras com mistura. Entre T4 e T5 verifica-se uma ligeira diminuição de 64 mg de N/100g de matéria seca nas amostras sem mistura e de 80 mg de N/100g de matéria seca nas amostras com mistura.

O tempo correlaciona-se de forma altamente significativa ($R^2 = 0,6869$) com o teor de AA, e o seu efeito faz-se sentir, aumentando de forma significativa, durante toda a fase de secagem (entre T2 e T4) nas amostras sem mistura e apenas na 1ª fase deste processo (entre T2 e T3) nas amostras com mistura, e diminuindo significativamente no período de armazenamento para os dois ensaios.

O efeito da mistura no teor em AA faz-se sentir de forma significativa em T1 e T5, com teores, sempre inferiores para as amostras com mistura, de 136 ± 18 mg de N/100g de matéria seca contra 181 ± 20 mg de N/100g de matéria seca e de 217 ± 30 mg de N/100g de matéria seca contra 275 ± 22 mg de N/100g de matéria seca, respectivamente.

Segundo Waade e Stahnke (1997), a quantidade de AA dos enchidos varia entre 300 e 1400 mg de N/100g de matéria seca. Os produtos analisados neste trabalho apresentam em T4 (produto final) um valor médio de 318 ± 30 mg de N/100g de matéria seca, próximo do mínimo referido pelos autores anteriores. Tal como já foi referido para a percentagem de IP, os teores em AA mais elevados ocorrem em enchidos com culturas “starters” adicionadas e sujeitos a um período de cura longo (Huang e Lin, 1993), o que pode justificar os valores baixos encontrados neste trabalho, já que, nenhuma destas condições se verificou.

Os aminoácidos livres, juntamente com outros compostos azotados constituem a fracção de NPN. Por forma a melhor avaliar a contribuição do teor em AA para o valor de NPN obtido em cada um dos tempos e ensaios estudados, procedeu-se ao cálculo da razão entre AA e NPN, cujos resultados são apresentados no quadro e na figura 3.8.

O efeito do tempo na percentagem de AA/NPN faz-se sentir, com um perfil semelhante nos dois ensaios, apresentando um aumento até ao produto final (T4) e uma diminuição significativa durante o armazenamento (T5). O aumento da percentagem de AA/NPN é significativo ($p < 0,05$) durante a 2ª metade da fase de secagem (entre T3 e T4) nas amostras sem mistura e na 1ª metade da fase de secagem (entre T2 e T3) nas amostras com mistura.

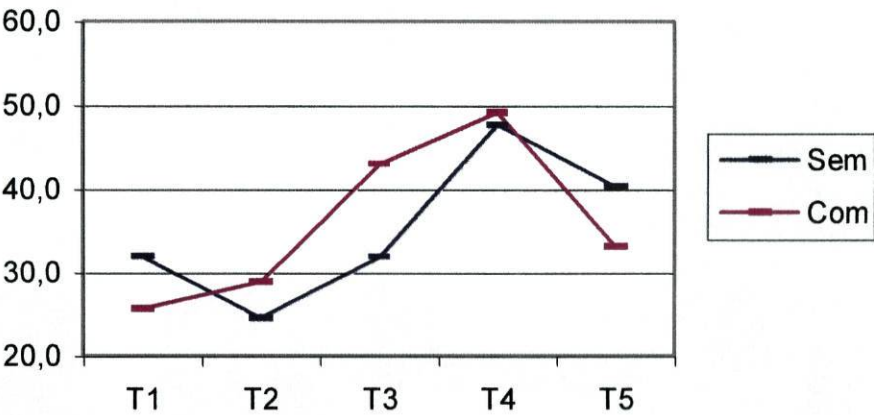
Quadro 3.8 – Resultados médios da % de AA / NPN (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	32,0 ± 6,2 ^{al}	24,5 ± 5,1 ^{al}	31,9 ± 3,3 ^{al}	47,6 ± 5,9 ^{cl}	40,3 ± 2,8 ^{dl}	35,3 ± 9,8
Com	25,6 ± 2,7 ^{al}	28,8 ± 3,0 ^{al}	42,9 ± 4,8 ^{bc2}	49,1 ± 5,9 ^{bl}	33,2 ± 6,4 ^{ac1}	35,9 ± 8,6
Média	28,8 ± 4,5	26,7 ± 3,0	37,4 ± 7,8	48,4 ± 1,1	36,8 ± 5,0	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.8 – Resultados médios da % de AA / NPN ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O efeito da adição da mistura na percentagem de AA/NPN só se faz sentir de forma significativa ($p<0,05$) em T3 (após 10 dias de fabrico), com valores de $31,9 \pm 3,3$ % para as amostras sem mistura e de $42,9 \pm 4,8$ % nas amostras com mistura. Apesar de se verificar, de uma maneira geral, uma maior percentagem de AA/NPN nos produtos com mistura, os valores médios obtidos para os dois ensaios nos 5 tempos estudados são semelhantes e de cerca de 35%.

A percentagem média de AA/NPN para os dois ensaios, aumentou 10,7% na 1ª metade da fase de secagem e 11% na 2ª metade, apresentando uma descida de 11,6% durante o armazenamento.

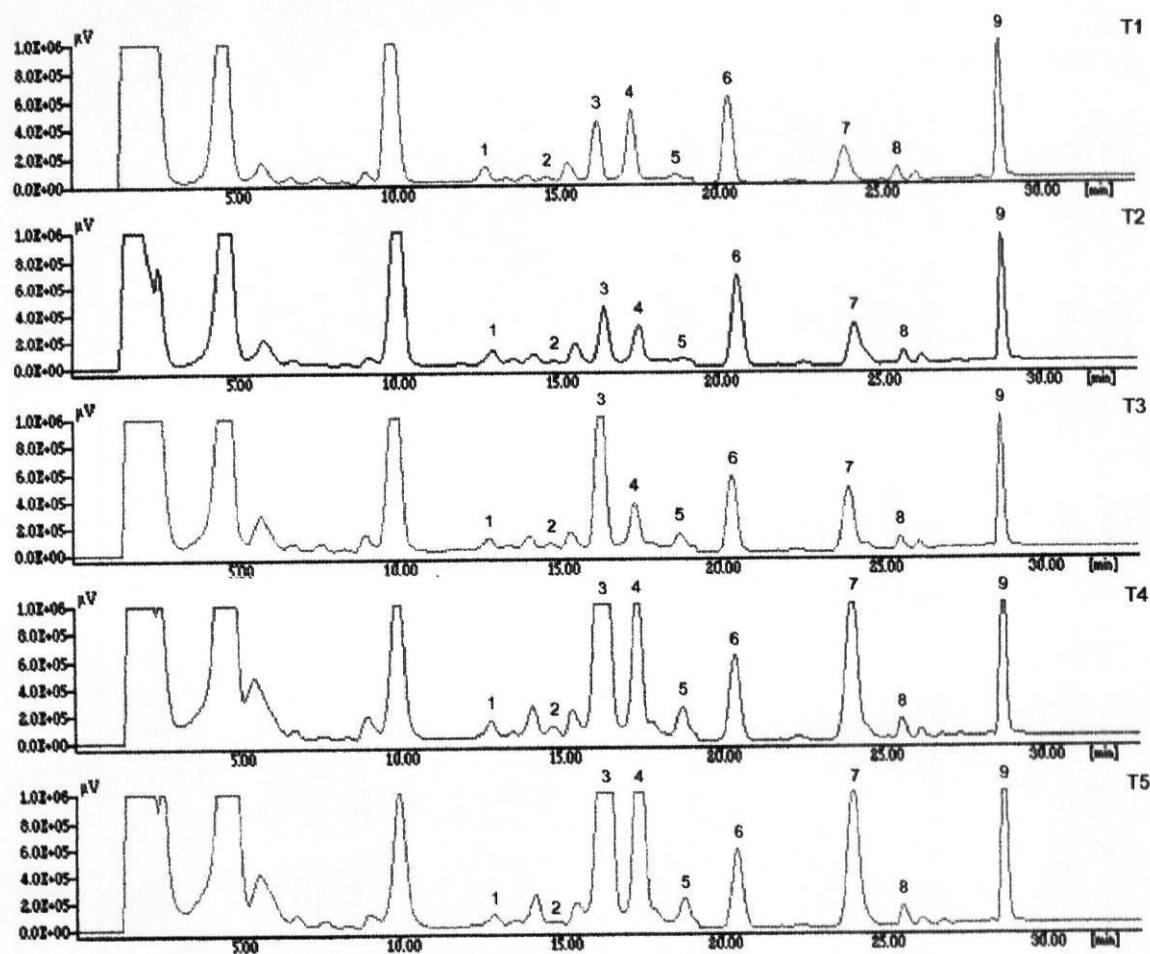
O aumento da percentagem de AA durante o processo de fabrico dos enchidos resulta essencialmente da actividade exopeptidásica dos microrganismos, que são também responsáveis pela sua transformação, através de outro tipo de reacções enzimáticas (desaminação, transaminação, descarboxilação, entre outras) noutros compostos, como α - cetoácidos, aldeídos ou aminas (Masson, 1998).

Os resultados obtidos neste trabalho para a percentagem de AA/NPN estão de acordo com os obtidos por Demeyer (1992), que verificou um aumento desta percentagem até ao produto final, obtendo um valor de 44,1%, ligeiramente inferior à média dos dois ensaios em T4 ($48,4 \pm 1,1\%$).

3 – AMINAS BIOGÊNICAS E POLIAMINAS NATURAIS

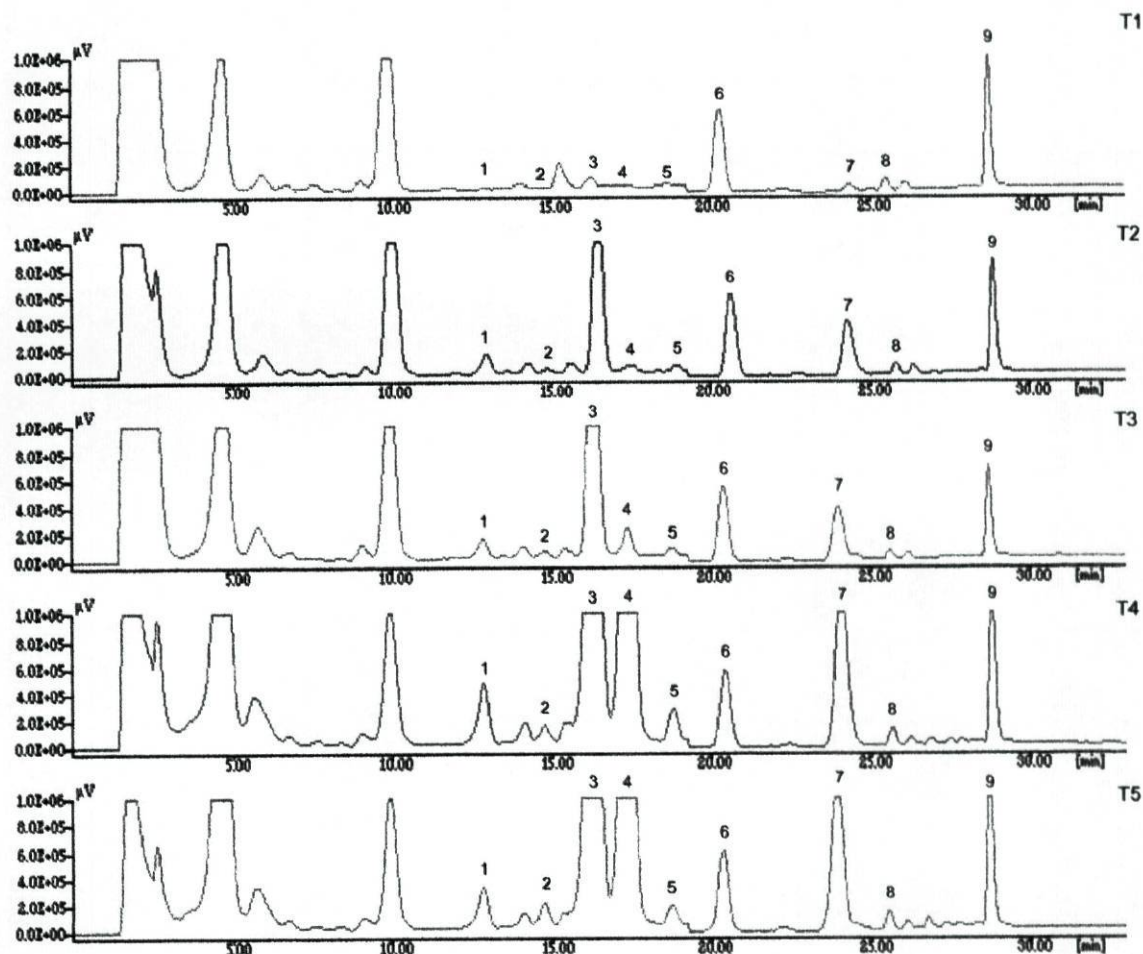
As figuras 3.9 a 3.12 apresentam os cromatogramas, obtidos nas condições descritas no ponto 2.3 da parte experimental deste trabalho, das amostras sem e com mistura acidificante / antioxidante nos 5 tempos de fabrico / armazenamento estudados.

Figura 3.9 – Cromatogramas obtidos por HPLC/fluorescência para a quantificação da triptamina e da β -feniletilamina nas amostras sem mistura nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.



1 – triptamina; 2 - β -feniletilamina; 3 – putrescina; 4 – cadaverina; 5 – histamina; 6 – IS; 7 – tiramina; 8 - espermidina; 9 - espermina.

Figura 3.10 – Cromatogramas obtidos por HPLC/fluorescência para a quantificação da triptamina e da β -feniletilamina nas amostras com mistura nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.



1 – triptamina; 2 - β -feniletilamina; 3 – putrescina; 4 – cadaverina; 5 – histamina; 6 – IS; 7 – tiramina; 8 - espermidina; 9 - espermina.

A observação da separação cromatográfica e das áreas da triptamina e da β -feniletilamina obtidas com detecção por fluorescência (figuras 3.9 e 3.10) e com detector de UV (figuras 3.11 e 3.12), evidenciam a vantagem da utilização do detector de fluorescência (ganho 10) na quantificação destas aminas, já que, com este detector se obtêm picos com maiores áreas e menos picos interferentes, o que facilita a integração das áreas e a quantificação destas aminas.

A detecção por fluorescência da espermidina, por ser, tal como as anteriores, uma amina minoritária em enchidos, seria vantajosa. No entanto, sendo uma poliamina natural, tal como a espermina, com estrutura semelhante, optou-se pela sua detecção/quantificação por UV.

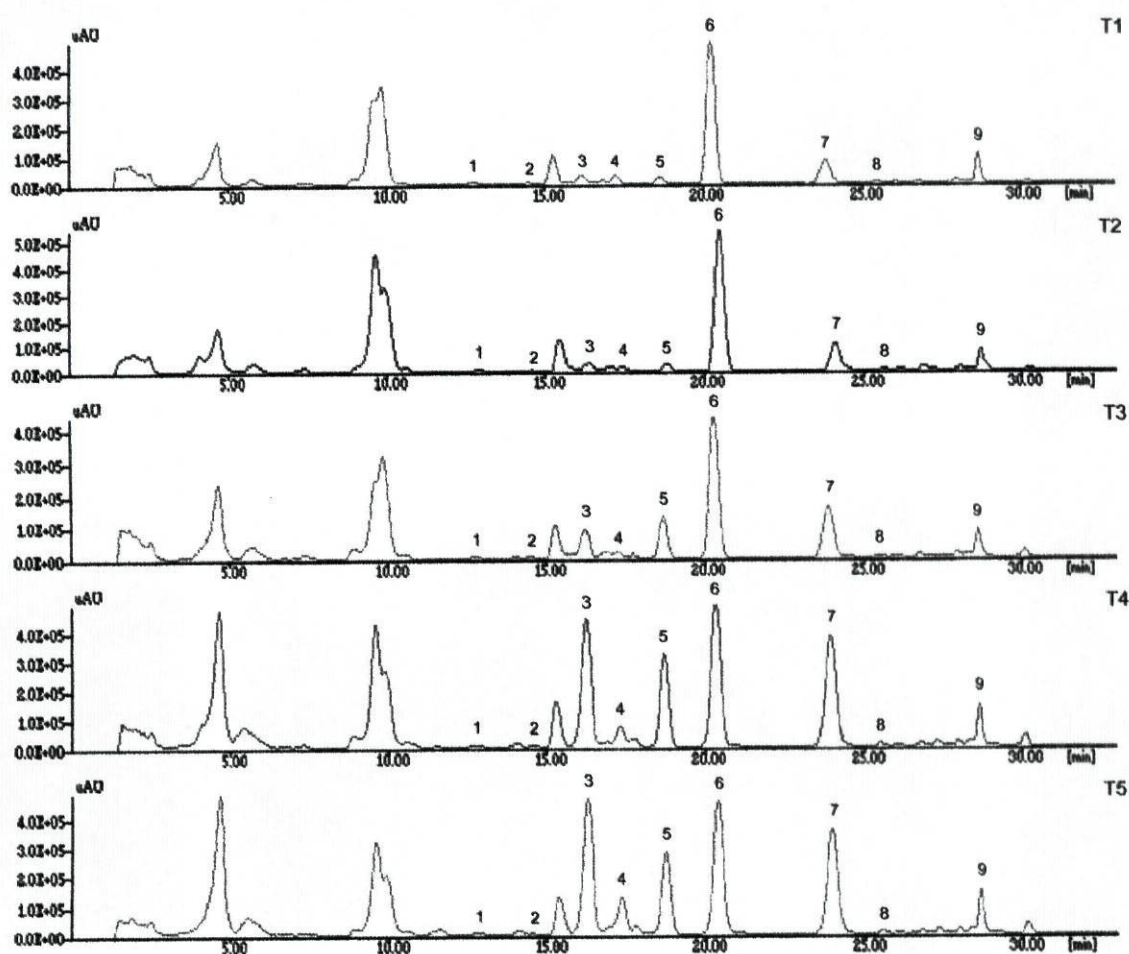
Observando as figuras 3.9 e 3.10 verifica-se a impossibilidade de detectar a putrescina, a cadaverina, a tiramina e a espermina por fluorescência (ganho 10), já que, quando estas aminas

ocorrem numa concentração elevada (T4 e T5), os picos cromatográficos correspondentes são cortados na escala definida pelo detector, impossibilitando a correcta quantificação das suas áreas.

A evolução da triptamina e da β -feniletilamina nas amostras sem mistura não é clara só pela observação do cromatograma 3.9, porque estas aminas apresentam áreas (especialmente a β -feniletilamina) próximas do limite de quantificação.

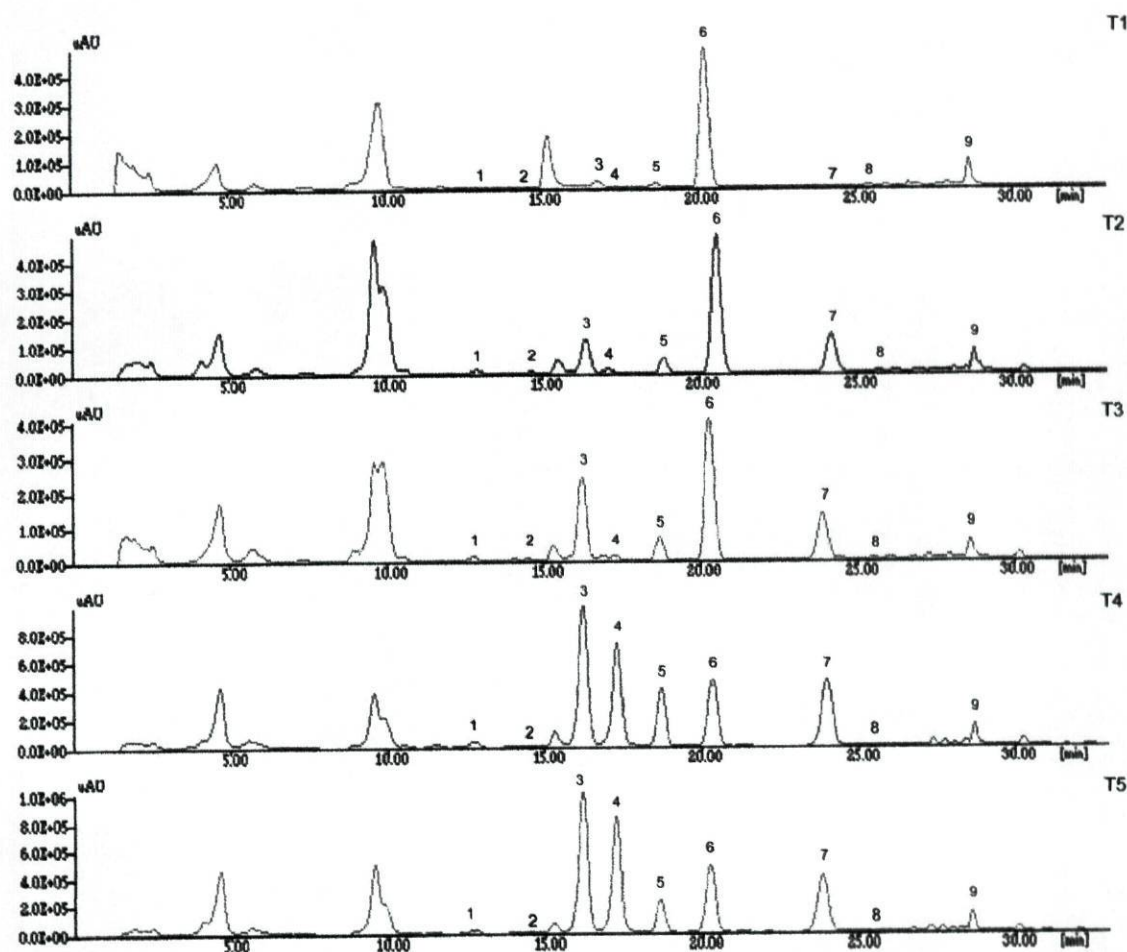
Observando a evolução das mesmas aminas nas amostras com mistura (cromatograma 3.10) torna-se evidente o aumento da área de ambas ao longo do processo de fabrico.

Figura 3.11 – Cromatogramas obtidos por HPLC/UV para a quantificação da putrescina, da cadaverina, da histamina, da tiramina, da espermidina e da espermina nas amostras sem mistura nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.



1 – triptamina; 2 - β -feniletilamina; 3 – putrescina; 4 – cadaverina; 5 – histamina; 6 – IS; 7 – tiramina; 8 - espermidina; 9 - espermina.

Figura 3.12 – Cromatogramas obtidos por HPLC/UV para a quantificação da putrescina, da cadaverina, da histamina, da tiramina, da espermidina e da espermina nas amostras com mistura nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.



1 – triptamina; 2 - β -feniletilamina; 3 – putrescina; 4 – cadaverina; 5 – histamina; 6 – IS; 7 – tiramina; 8 – espermidina; 9 - espermina.

Observando os cromatogramas obtidos em UV das amostras sem (figura 3.11) e com mistura (figura 3.12) verifica-se um perfil cromatográfico distinto nas amostras dos dois ensaios. Ocorreu um aumento das áreas de quase todas as aminas estudadas ao longo do processo de fabrico / armazenamento, o qual é mais acentuado nas amostras com mistura. As aminas maioritárias no produto final (T4) destas amostras são, a putrescina, a cadaverina, a histamina e a tiramina. Nas amostras sem mistura, as aminas maioritárias são as mesmas, no entanto, a histamina apresenta maiores áreas que a cadaverina e, nas amostras com mistura, verifica-se o contrário. Estas aminas que foram detectadas maioritariamente durante o processo de maturação das amostras dos dois ensaios, são também as mais referidas na literatura.

Em ambas as amostras, torna-se difícil quantificar as áreas da espermidina porque esta ocorre em teores muito baixos e está rodeada por alguns picos interferentes.

As figuras 3.13 e 3.14 apresentam a evolução dos teores das 8 aminas estudadas ao longo dos 5 tempos de fabrico / armazenamento, nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

Figura 3.13 – Resultados médios dos teores das 8 aminas estudadas em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento das amostra sem mistura.

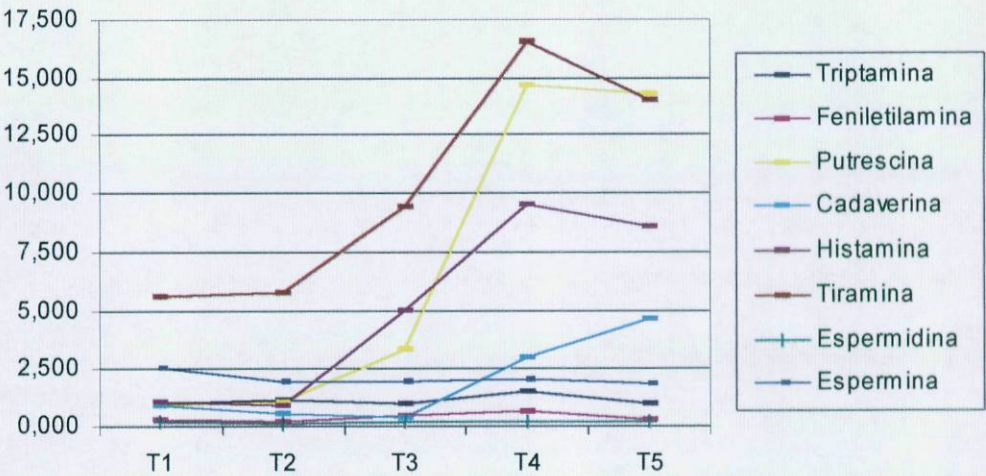
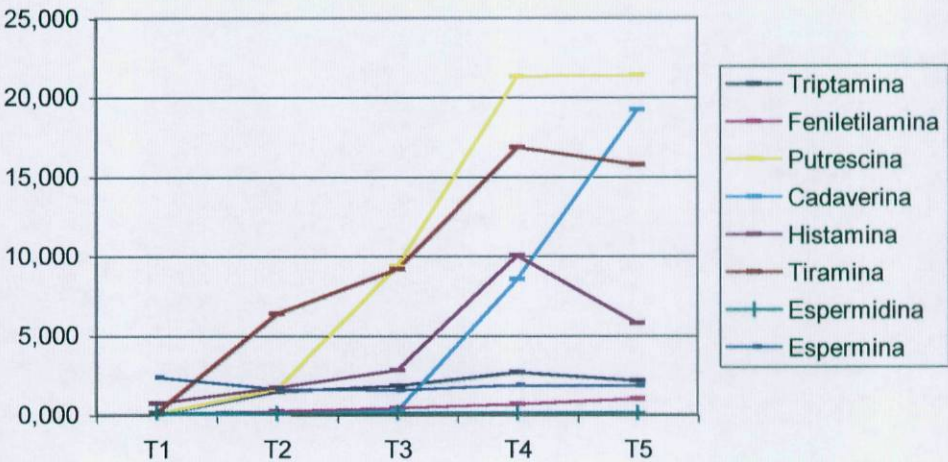


Figura 3.14 – Resultados médios dos teores das 8 aminas estudadas em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento das amostra com mistura.



Observando as figuras 3.13 e 3.14 parecem existir diferenças entre as amostras dos dois ensaios, tanto ao nível do perfil de evolução como em termos quantitativos. As figuras mostram dois grupos de aminas em termos quantitativos e com evoluções diferentes no tempo. O grupo das aminas maioritárias, já referidas anteriormente, cujos teores aumentam bastante, especialmente durante o período de secagem dos enchidos (de T2 a T4). O grupo das aminas

minoritárias, cujos teores se mantêm relativamente constantes, ou apresentam ligeiros aumentos durante o mesmo período, e que são a triptamina, a β-feniletilamina, a espermidina e a espermina.

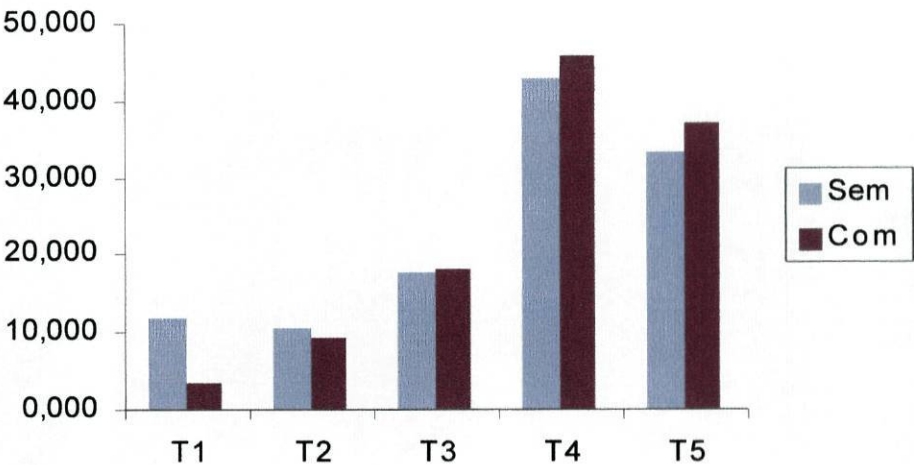
A figura 3.15 e o quadro 3.9 apresentam o teor total de aminas em cada tempo de fabrico / armazenamento estudados nas amostras sem e com mistura acidificante / antioxidante.

Quadro 3.9 – Resultados médios do teor total de aminas mg/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	11,752±0,923 ^a	10,492±0,764 ^a	17,844±7,908 ^a	42,896±9,079 ^b	33,166±10,857 ^b	23,230±14,220
Com	3,449±0,145 ^a	9,374±5,317 ^{ab}	18,175±6,987 ^b	45,663±24,784 ^b	37,148±34,226 ^{ab}	22,760±18,060
Média	7,601±5,871	9,933±0,791	18,010±0,234	44,280±1,957	35,157±2,816	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.15 – Resultados médios do teor total de aminas mg/100g de matéria seca nos 5 tempos de fabrico / armazenamento, nas amostras sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O teor total de aminas observado em cada tempo estudado é muito semelhante nas amostras dos dois ensaios. A única exceção verifica-se em T1, momento em que as amostras

sem mistura apresentam um teor total de aminos 3,4 vezes superior. O teor total médio de aminos aumenta 5,8 vezes durante o fabrico das linguiças até ao produto final (T4) e diminui ligeiramente durante o armazenamento.

Nas amostras sem mistura, o aumento do teor total de aminos só é significativo ($p < 0,05$) durante a 2ª metade da fase de secagem (entre T3 e T4). Nas amostras com mistura, o aumento do teor total de aminos é gradual, verificando-se diferenças significativas ($p < 0,05$) apenas entre o primeiro (T1) e os dois últimos (T3 e T4) tempos de fabrico.

Não se verificam diferenças significativas, no teor total de aminos, entre as aminos dos dois ensaios. Obtiveram-se, no produto final, teores de 42,896 e 45,663 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

Ao longo do tempo não se verificou uma correlação significativa ($p > 0,05$) entre o pH e o teor total de aminos. No entanto, o teor total de aminos aumenta de forma mais marcada durante a fase de secagem (entre T2 e T4), quando o pH sobe e se encontra entre 5,0 e 5,2, intervalo que está dentro do considerado óptimo por Teodorovic *et al.* (1994) para a produção de aminos (4,0 a 5,5).

Entre T1 e T2, período que abrange a fase de fermentação, ocorre a descida de pH mais acentuada, no entanto, a produção de aminos nas amostras sem mistura não se verifica e é muito ligeira nas amostras com mistura, o que se pode dever à dificuldade de crescimento dos microrganismos que não sejam bactérias lácticas (Maijala, 1994b).

Em T1, as amostras com mistura têm um teor total de aminos mais baixo porque, como já foi referido anteriormente, a queda brusca de pH que ocorre nestas amostras durante o repouso da massa, por influência da GDL, pode dificultar o crescimento de certos microrganismos e levar à destruição de outros com actividade aminoácido-descarboxilase. A maior produção de aminos, que se verifica durante a fase de secagem e o armazenamento destas amostras, comparativamente às amostras sem mistura, pode então resultar do mecanismo de defesa dos microrganismos contra ambientes ácidos, ou da actividade aminoácido-decarboxilásica dos microrganismos que sobrevivem à queda inicial do pH e que podem ser algumas estirpes de bactérias lácticas como *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, entre muitas outras referidas na literatura.

Durante o processo de fabrico não se verifica que a diminuição da a_w contribua para a diminuição do teor total de aminos, no entanto, os valores de a_w durante este período não são suficientemente baixos para dificultar o metabolismo microbiano, o que só acontece quando a a_w atinge valores inferiores ou iguais a 0,91. Isto verifica-se apenas a partir de T4, momento a partir do qual ocorre uma redução, apesar de ligeira, do teor total de aminos.

Porque as aminas biogénicas resultam essencialmente da descarboxilação dos aminoácidos, e estes da actividade proteolítica que se verifica durante o processo de maturação dos enchidos, seria de esperar, tal como verificou Bover-Cid *et al.* (1999a), uma correlação significativa ($p>0,05$) entre os teores de AA, NPN e IP e o teor total de aminas. No entanto, e apesar do teor total de aminas mostrar correlações de 0,8386, 0,9233 e 0,9587, respectivamente, com os parâmetros anteriores, estas não são significativas ($p>0,05$).

Relativamente à evolução do teor de AA, este segue o mesmo perfil do teor total de aminas nas amostras dos dois ensaios. Verifica-se que, o aumento durante o fabrico e a diminuição durante o armazenamento do teor de aminoácidos livres, é acompanhado do aumento e da diminuição do teor total de aminas nos dois períodos, respectivamente.

3.1 – Aminas biogénicas

Os teores médios de triptamina, obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento nos 2 ensaios estudados, são apresentados no quadro 3.10 e na figura 3.16.

Quadro 3.10 – Resultados médios do teor de triptamina expressos em mg/100g de matéria seca (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	0,934 \pm 0,078 ^{a1}	1,146 \pm 0,112 ^{a1}	0,977 \pm 0,185 ^{a1}	1,458 \pm 0,264 ^{ab1}	0,953 \pm 0,116 ^{b1}	1,094 \pm 0,220
Com	0,061 \pm 0,013 ^{a2}	1,448 \pm 0,158 ^{b1}	1,813 \pm 0,282 ^{bc2}	2,668 \pm 0,106 ^{cd2}	2,128 \pm 0,474 ^{d2}	1,624 \pm 0,982
Média	0,498 \pm 0,617	1,297 \pm 0,214	1,395 \pm 0,591	2,063 \pm 0,856	1,541 \pm 0,831	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)

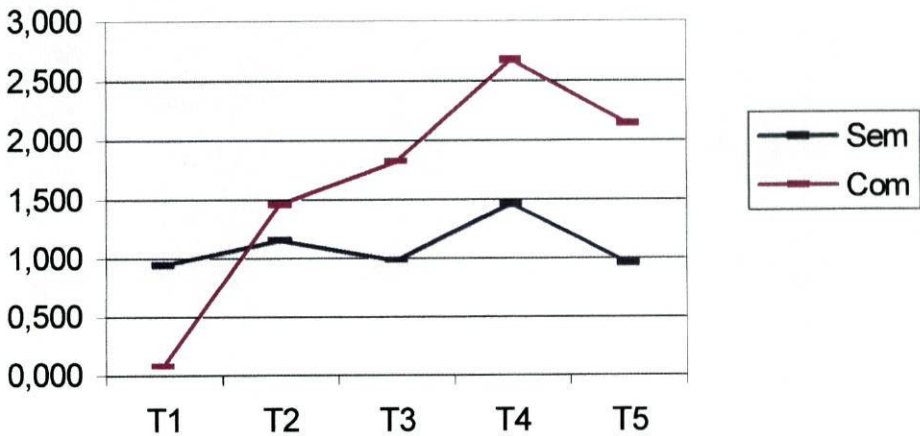
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)

Apesar de se verificar um aumento da produção de triptamina na 2ª metade da fase de secagem (entre T3 e T4), e uma diminuição durante o armazenamento, comuns às amostras dos dois ensaios, não se verificam diferenças significativas ($p>0,05$) entre tempos de fabrico / armazenamento adjacentes durante estes períodos.

Durante os primeiros 10 dias de fabrico (T1 a T3), as amostras dos dois ensaios mostraram comportamentos diferentes. As amostras sem mistura apresentaram teores de

triptamina relativamente constantes e as amostras com mistura apresentaram um aumento progressivo, que foi significativo durante a fase de fermentação (entre T1 e T2).

Figura 3.16 – Resultados médios do teor de triptamina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O efeito da mistura fez-se sentir nos teores de triptamina obtidos, após 3 dias de mistura da massa (T1), momento no qual as amostras com mistura apresentaram teores muito baixos ($0,061 \pm 0,013$ contra $0,934 \pm 0,078$ mg/100g de matéria seca), e em todos os tempos estudados a partir dos 10 dias de fabrico, momentos nos quais as amostras com mistura apresentaram teores mais altos que as amostras sem mistura.

Os teores de triptamina encontrados no produto final são geralmente baixos, podendo mesmo não ser detectada esta amina (Paulsen *et al.*, 1997). No entanto, também estão descritos teores superiores a 6,600 mg/100g de produto (Eitenmiller *et al.*, 1978). Os teores de triptamina encontrados no produto final foram, $1,458 \pm 0,264$ e $2,668 \pm 0,106$ mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

A diminuição dos teores desta amina, verificada durante o período de armazenamento dos produtos, foi igualmente verificada por Bover-Cid *et al.* (2000) em enchidos armazenados durante 20 dias a 4°C.

Os teores médios de triptamina dos dois ensaios aumentam 4,14 vezes até ao produto final e diminuem 0,75 vezes durante o armazenamento. As amostras com mistura apresentam um teor médio de triptamina nos 5 tempos 1,48 vezes superior às amostras sem mistura.

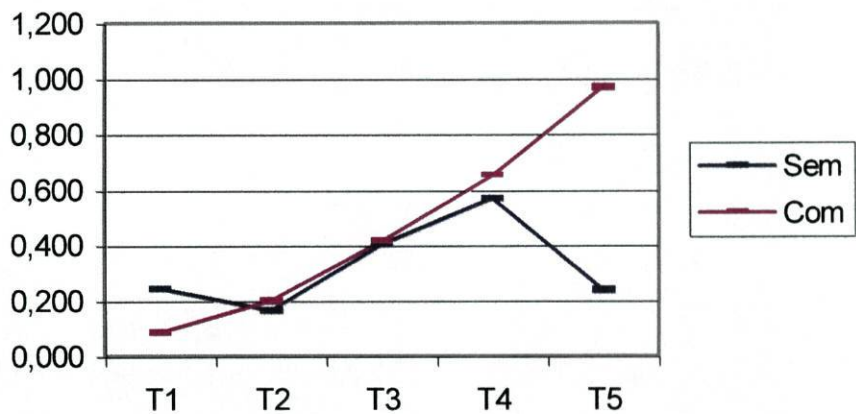
Os teores médios de β -feniletilamina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.11 e na figura 3.17.

Quadro 3.11 – Resultados médios do teor de β -feniletilamina expressos em mg/100g de matéria seca (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	0,242 \pm 0,032 ^{a1}	0,165 \pm 0,014 ^{b1}	0,401 \pm 0,062 ^{c1}	0,569 \pm 0,036 ^{d1}	0,239 \pm 0,045 ^{ab1}	0,323 \pm 0,162
Com	0,084 \pm 0,002 ^{a2}	0,198 \pm 0,064 ^{a1}	0,416 \pm 0,076 ^{b1}	0,652 \pm 0,066 ^{c1}	0,971 \pm 0,198 ^{d2}	0,464 \pm 0,357
Média	0,163 \pm 0,112	0,182 \pm 0,023	0,409 \pm 0,011	0,611 \pm 0,059	0,605 \pm 0,518	

a, b, c – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
1, 2 – médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.17 – Resultados médios do teor de β -feniletilamina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Observando a figura 3.17 verifica-se que a produção de β -feniletilamina apresenta um perfil de evolução comum apenas durante a 1ª metade do processo de secagem nas amostras dos dois ensaios. Durante este período há um aumento significativo (p<0,05) dos teores de β -feniletilamina nas amostras dos dois ensaios, que continua a verificar-se de forma significativa até ao fim do período de armazenamento nas amostras com mistura. O aumento dos teores de β -feniletilamina nas amostras sem mistura, apesar de significativo, é menos acentuado na 2ª metade

do processo de secagem, verificando-se uma diminuição significativa dos teores desta amina durante o armazenamento, atingindo um valor de $0,239 \pm 0,045$ mg/100g de matéria seca, próximo dos observados no início do processo de fabrico (em T1 e T2).

As amostras dos dois ensaios só se distinguem estatisticamente ($p<0,05$) no 1º tempo de fabrico estudado (T1), com teores de $0,242 \pm 0,032$ e $0,084 \pm 0,002$ mg/100g de matéria seca, e no último (T5), com teores de $0,239 \pm 0,045$ e $0,971 \pm 0,198$ mg/100g de matéria seca, nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

Os teores de β -feniletilamina mostram uma correlação significativa ($R^2=0,9994$; $p=0,023$) com os teores de triptamina. As duas aminas apresentam valores mais baixos no início do processo de fabrico e mais elevados no fim do tempo de armazenamento nas amostras com mistura. Os teores de β -feniletilamina referidos na bibliografia em enchidos são geralmente mais elevados que os de triptamina (Shalaby e Abd-el-Rahman, 1995). No entanto, também se verifica o contrário (Bover-Cid *et al.*, 2000) como neste trabalho.

Paulson e Bauer (1997), detectaram teores de β -feniletilamina bastante baixos em enchidos, enquanto que Shalaby e Abd-el-Rahman (1995) encontraram teores de 9mg/100g de produto. Bover-Cid *et al.* (2000) verificaram um aumento do teor desta amina, de 1,16 vezes durante o armazenamento, aumento que é inferior ao encontrado nas amostras com mistura no mesmo período (1,50 vezes). Pelo contrário, Eerola *et al.*, (1997), não verificaram a produção de β -feniletilamina durante o armazenamento de enchidos embalados sob-vácuo.

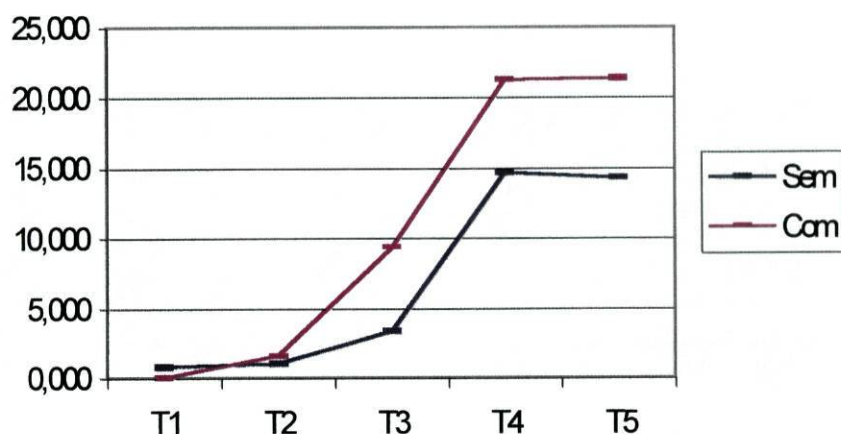
Os teores médios de putrescina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.12 e na figura 3.18.

Quadro 3.12 – Resultados médios do teor de putrescina expressos em mg/100g de matéria seca (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	$0,837\pm0,063^{a1}$	$1,019\pm0,150^{ab1}$	$3,336\pm0,344^{b1}$	$14,668 \pm 1,405^{c1}$	$14,319 \pm 1,898^{c1}$	$6,836\pm7,061$
Com	$0,031\pm0,008^{a1}$	$1,537\pm0,510^{a1}$	$9,325\pm1,892^{b2}$	$21,272\pm2,829^{c2}$	$21,360\pm3,485^{c2}$	$10,705\pm10,309$
Média	$0,434\pm0,570$	$1,278\pm0,366$	$6,331\pm4,235$	$17,970\pm4,670$	$17,840\pm4,979$	

a, b, c – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)
1, 2 - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)

Figura 3.18 – Resultados médios do teor de putrescina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Observando a figura 3.18 verifica-se que o perfil de evolução dos teores de putrescina ao longo do tempo é semelhante nas amostras dos dois ensaios. Há um aumento dos teores de putrescina durante o processo de fabrico, menos acentuado até aos 10 dias (T3), mas permitindo a distinção significativa entre T1 e T3, e mais acentuado na 2ª metade da fase de secagem, apresentando igualmente diferenças significativas neste período. Durante o armazenamento, os teores de putrescina mantêm-se relativamente constantes.

As amostras dos dois ensaios distinguem-se entre os 10 dias de fabrico e no fim do tempo de armazenamento (T3, T4 e T5) com teores sempre mais elevados nas amostras com mistura, que apresentam um valor médio dos 5 tempos igual a 10,705 contra 6,836 mg/100g de matéria seca das amostras sem mistura.

Diversos autores referem teores de putrescina superiores a 30 mg/100g de matéria seca (Paulsen *et al.*, 1997). De acordo com Paulsen e Bauer (1997), teores superiores a 10 mg/100g de matéria seca podem indicar a utilização de carne armazenada durante longos períodos de tempo. Neste trabalho, esta hipótese não se confirma, já que, apesar de se verificarem teores elevados de putrescina no produto final das amostras sem e com mistura de $14,668 \pm 1,405$ e $21,272 \pm 2,829$ mg/100g de matéria seca, respectivamente, as linguiças foram processadas a partir de carne de porco fresca, de animais recém abatidos, e sob condições higio-sanitárias controladas. Para além disto, os teores de putrescina ao fim de 3 dias de mistura da massa (T1) são bastante baixos ($0,837 \pm 0,063$ e $0,031 \pm 0,008$ mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura respectivamente) em comparação com os valores finais (T4). Os valores começam a aumentar durante a 1ª fase do processo de secagem (entre T2 e T3), intervalo de tempo onde os valores de

pH obtidos são inferiores ou iguais a 5,0 e, deste modo, suficientemente baixos para permitirem a actividade metabólica de grande parte da microflora contaminante presente nas linguças.

Durante o armazenamento, os teores de putrescina das amostras dos dois fabricos, sofreram variações insignificantes relativamente aos teores obtidos no produto final, o que sugere a dificuldade da microflora em descarboxilar a ornitina em condições de anaerobiose e a temperaturas de refrigeração.

Os teores médios de cadaverina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nas duas formulações estudadas são apresentados no quadro 3.13 e na figura 3.19.

Quadro 3.13 – Resultados médios do teor de cadaverina expressos em mg/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	0,895±0,009 ^{a1}	0,537±0,133 ^{a1}	0,323±0,041 ^{a1}	2,923±0,409 ^{b1}	4,606±1,124 ^{c1}	1,857±1,852
Com	0,012±0,005 ^{a1}	0,022±0,008 ^{a1}	0,260±0,057 ^{a1}	8,490±2,099 ^{b2}	19,186±2,216 ^{c2}	5,594±8,423
Média	0,454±0,624	0,280±0,364	0,292±0,045	5,707±3,936	11,896±10,310	

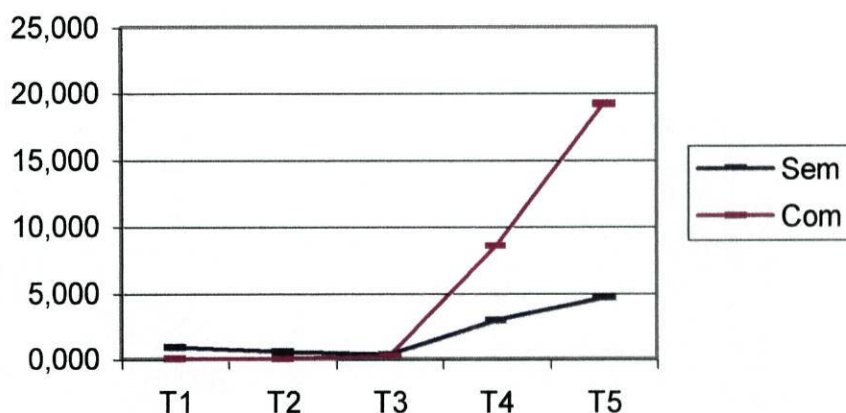
^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Tal como se verificou com os resultados obtidos para a putrescina, os teores de cadaverina seguem um perfil de evolução semelhante ao longo do tempo nas duas formulações.

Apesar de ocorrer uma redução seguida de um incremento dos teores nas amostras sem e com mistura, respectivamente, até aos 10 dias de fabrico estes não são significativos. A partir deste tempo (T3) e até ao T4, os teores de cadaverina aumentam, de forma significativa (p<0,05), 9,05 vezes e 32,65 vezes nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

Durante o período de armazenamento, os teores de cadaverina continuam a aumentar significativamente (p<0,05), atingindo valores 1,58 e 2,26 vezes maiores que os do produto acabado nas amostras sem e com mistura respectivamente.

Figura 3.19 – Resultados médios do teor de cadaverina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



O efeito da mistura só se fez sentir nos teores de cadaverina, de forma significativa, no produto final e após armazenamento, com teores 3 a 4 vezes superiores nas amostras com mistura. Os teores médios dos 5 tempos de 1,857 e 5,594 mg/100g de matéria seca, obtidos nas amostras sem e com mistura, respectivamente, são relativamente baixos quando comparados com os resultados obtidos nos últimos dois tempos estudados. Esta diferença reflecte os baixos teores de cadaverina encontrados nos 2 ensaios até aos 10 dias de fabrico.

A cadaverina é geralmente encontrada em concentrações baixas em enchidos com culturas iniciadoras (Shalaby, 1993), verificando-se teores entre 0,5 e 3 mg/100g de matéria seca.

As amostras sem mistura apresentam um teor de cadaverina de $2,923 \pm 0,409$ mg/100g de matéria seca no produto final, que está de acordo com os descritos anteriormente, e de $4,606 \pm 1,124$ mg/100g de matéria seca no fim do período de armazenamento, verificando-se um aumento proporcional ao obtido por Bover-Cid *et al.* (2000) num período de armazenamento inferior (20 dias).

As amostras com mistura apresentam teores bastante superiores aos descritos na literatura, de $8,490 \pm 2,099$ mg/100g de matéria seca no produto final, e de $19,186 \pm 2,216$ no final do armazenamento. O aumento verificado durante o armazenamento, nas duas formulações, pode resultar, da contaminação do produto final com microrganismos, capazes de descarboxilar a lisina, durante o embalamento, da actividade residual de descarboxilases produzidas nas fases iniciais do processo de maturação e/ou da activação de microrganismos produtores de aminas em condições de anaerobiose proporcionadas pela embalagem sob vácuo.

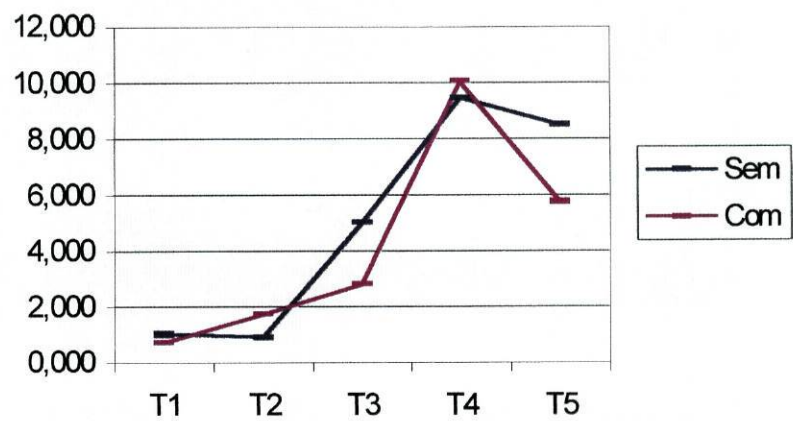
Os teores médios de histamina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.14 e na figura 3.20.

Quadro 3.14 – Resultados médios do teor de histamina expressos em mg/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	1,012±0,067 ^{a1}	0,867±0,083 ^{a1}	4,955±0,251 ^{b1}	9,459±0,568 ^{c1}	8,494±0,470 ^{d1}	4,957±4,033
Com	0,685±0,044 ^{a1}	1,684±0,278 ^{ab1}	2,775±0,414 ^{b2}	10,025±1,333 ^{c1}	5,732±0,893 ^{d2}	4,180±3,775
Média	0,849±0,231	1,276±0,578	3,865±1,541	9,742±0,400	7,113±1,953	

a, b, c – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
1, 2 - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.20 – Resultados médios do teor de histamina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Ao longo do tempo verifica-se um perfil de evolução, dos teores de histamina, semelhante para as amostras dos dois ensaios. Há um aumento dos teores até ao produto final, que só é significativo na segunda metade da fase de secagem nas amostras com mistura, e entre cada um dos tempos estudados, durante toda a fase de secagem, nas amostras sem mistura.

Durante o armazenamento ocorreu uma redução significativa ($p < 0,05$) dos teores de histamina nas amostras dos dois ensaios.

O efeito da adição de mistura faz-se sentir significativamente ($p < 0,05$) aos 10 dias de fabrico e no fim do período de armazenamento, com valores sempre mais baixos nas amostras com mistura, o que de uma maneira geral contraria os resultados encontrados para as amins analisadas anteriormente nestas amostras, com teores iguais ou superiores em T3 e superiores em T4.

Os teores de histamina, referidos na literatura em enchidos, variam muito, com a introdução ou não de culturas iniciadoras, com a qualidade das matérias-primas, e com a duração e as condições de maturação e armazenamento. De uma maneira geral, são encontrados valores inferiores a 0,05 mg/100g de matéria seca. No entanto, quando adicionadas culturas iniciadoras com capacidade para descarboxilar a histidina, podem ser atingidos valores de 80 mg/100g de matéria seca (Paulsen e Bauer, 1997). Os teores encontrados neste trabalho não são tão elevados como este último, mas também não são tão baixos como a maioria dos resultados citados na bibliografia.

As amostras dos dois ensaios apresentam em T1 teores muito semelhantes ($9,459 \pm 0,568$ e $10,025 \pm 1,333$ mg/100g de matéria seca), nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

A histamina apresenta uma correlação significativa com a percentagem de AA/NPN ($R^2 = 0,9993$; $p = 0,024$) evidenciando uma relação positiva entre a produção de histamina e a produção de aminoácidos livres. Dierick *et al.* (1974), verificaram um aumento generalizado dos teores de aminoácidos livres durante a maturação de enchidos com a redução apenas da histidina (percursora da histamina), da tirosina (percursora da tiramina) e da ornitina (percursora da putrescina).

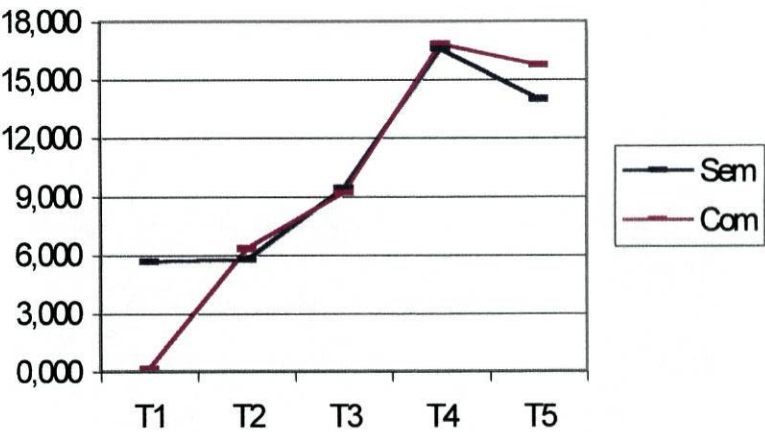
Os teores médios de tiramina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.15 e na figura 3.21.

Quadro 3.15 – Resultados médios do teor de tiramina expressos em mg/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	5,532±0,261 ^{a1}	5,752±0,310 ^{a1}	9,431±0,389 ^{b1}	16,573±0,528 ^{c1}	14,003±0,635 ^{d1}	10,258±4,930
Com	0,134±0,028 ^{a2}	6,322±1,056 ^{b1}	9,148±0,362 ^{b1}	16,834±1,955 ^{c1}	15,736±2,276 ^{c1}	9,635±6,902
Média	2,833±3,817	6,037±0,403	9,290±0,200	16,704±0,185	14,870±1,224	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.21 – Resultados médios do teor de tiramina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



De acordo com Santos *et al.* (1985), os teores de tiramina dependem do processo de maturação, e um período de latência de 1 ou 2 dias é geralmente seguido por um período de intensa formação desta amina (Eitenmiller *et al.*, 1978).

Ao longo do tempo, com exceção em T1, as amostras dos dois ensaios apresentam um perfil de desenvolvimento dos teores de tiramina praticamente iguais. Os teores de tiramina aumentam até ao produto final e diminuem durante o armazenamento. No entanto, nas amostras sem mistura, os teores aumentam significativamente em todos os tempos da fase de secagem estudados (T2 a T4), e diminuem também significativamente (p<0,05) durante o armazenamento.

Nas amostras com mistura, os teores de tiramina aumentam significativamente durante o período de tempo que abrange a fase de fermentação (T1 e T2). Os resultados obtidos nestas amostras durante o período de fermentação, são semelhantes aos observados nas aminas analisadas anteriormente, exceptuando a cadaaverina.

De uma maneira geral, verifica-se que as amostras com mistura apresentam um teor de aminas inferior após mistura da massa, que pode resultar, como referido anteriormente, da queda brusca de pH devida à presença de GDL, com consequente destruição de alguma microflora contaminante produtora de aminas. No entanto, durante a fermentação (entre T1 e T2), processo em que ocorre um grande desenvolvimento da microflora láctica, a produção de aminas atinge ou ultrapassa o valor obtido nas amostras sem mistura. Estes resultados levam-nos a suspeitar que, a produção de aminas nas amostras com mistura seja consequência essencialmente da actividade das bactérias lácticas presentes nos produtos, e nas amostras sem mistura a sua produção seja repartida entre estas, a microflora contaminante indesejável e microrganismos desejáveis como algumas estirpes da família *Micrococcacea*.

O aumento dos teores de tiramina nas amostras com mistura volta a ser significativo durante a 2ª metade da fase de secagem (entre T3 e T4), não se verificando diferenças significativas durante o período de armazenamento.

As amostras dos dois ensaios só se distinguem em T1 com valores de tiramina bastante mais baixos nas amostras com mistura, de $0,134 \pm 0,028$ contra $5,532 \pm 0,261$ mg/100g de matéria seca.

Os resultados médios dos teores de tiramina das amostras dos dois ensaios ao longo do tempo, mostram um aumento dos teores de quase 6 vezes durante o processo de fabrico e uma diminuição de 0,89 vezes durante o armazenamento.

Os teores médios dos 5 tempos são semelhantes nas amostras dos dois ensaios, $10,258 \pm 4,930$ e $9,635 \pm 6,902$ mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente.

A ocorrência de teores elevados de tiramina em enchidos fermentados é descrita com muita frequência, podendo atingir teores potencialmente tóxicos de 125 mg/100g (Buncic *et al.*, 1993). Os resultados obtidos neste trabalho revelam a importância da tiramina que, junto com a putrescina, surgem como aminas maioritárias nas linguças dos dois ensaios. Apesar disto, os teores de tiramina não mostraram ser excessivamente elevados comparativamente com os resultados de autores como Paulsen *et al.* (1997) que encontraram valores médios próximos de 15,0 mg/100g de matéria seca contra os 16,7 mg/100g de matéria seca encontrados neste trabalho.

Dierick *et al.* (1974) verificaram que durante o processo de maturação de enchidos fermentados, uma queda dos valores de tirosina é acompanhada pelo aumento dos valores de tiramina. Eitenmiller *et al.* (1978) verificaram, por sua vez, que o factor principal para a formação de tiramina em enchidos fermentados é a presença de tirosina livre no meio, e não a presença de culturas iniciadoras com capacidade para descarboxilar a tirosina.

Os teores de tiramina obtidos neste trabalho mostram uma correlação significativa com o índice de proteólise ($R^2=0,9982$; $p=0,038$) e deste modo muito provavelmente com o teor de tirosina livre.

Eerola e Maijala (1999) verificaram uma menor produção de tiramina e de histamina em produtos com GDL, que foi justificada pelo crescimento retardado de microrganismos amino-positivos em ambientes ácidos comparativamente com as culturas iniciadoras. Os resultados obtidos neste trabalho para o produto final não mostraram diferenças nos teores de histamina e de tiramina entre a utilização ou não de GDL. Por outro lado, Buncic *et al.* (1993) verificaram um aumento dos teores de tiramina com adição de GDL e sem adição de culturas iniciadoras. Os resultados discordantes apresentados pelos autores citados anteriormente devem-se provavelmente, no 1º caso, à introdução de culturas iniciadoras sem capacidade para produzirem aminas, e no 2º caso, à presença de uma microflora láctica natural com capacidade para as produzir.

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a GDL não é um bom substituto das culturas iniciadoras ao nível da produção de aminas biogénicas, já que, de uma maneira geral, se verifica um incremento dos seus teores com a introdução deste aditivo. Isto acontece, muito provavelmente porque, mais importante do que fazer baixar o pH para destruir a microflora contaminante produtora de aminas, é importante conhecer a capacidade da microflora láctica para produzir estes compostos, já que, com ou sem GDL, estes microrganismos ocorrem maioritariamente em enchidos secos fermentados de forma natural, ou por introdução. Assim, não basta trabalhar com matérias-primas de boa qualidade e em condições higio-sanitárias adequadas, por forma a evitar a contaminação dos produtos durante o processamento e armazenamento, para evitar a produção de aminas biogénicas em enchidos secos curados, embora estas condições possam ser suficientes para baixar a produção de aminas a níveis considerados não tóxicos.

3.2 – Poliaminas naturais

Os teores médios de espermidina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.16 e na figura 3.22.

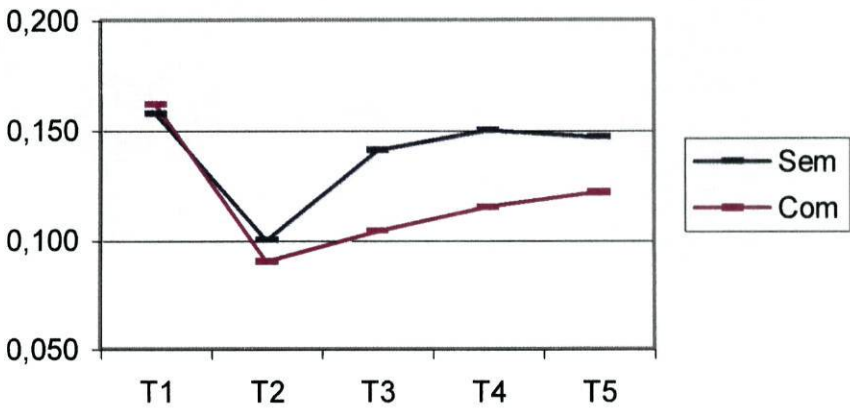
Quadro 3.16 – Resultados médios do teor de espermidina expressos em mg/100g de matéria seca (média ± desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	0,158±0,013 ^{a1}	0,100±0,017 ^{b1}	0,141±0,015 ^{a1}	0,150±0,006 ^{a1}	0,147±0,014 ^{a1}	0,139±0,023
Com	0,162±0,015 ^{a1}	0,090±0,007 ^{b1}	0,104±0,011 ^{bc2}	0,115±0,012 ^{bc2}	0,122±0,015 ^{c1}	0,119±0,027
Média	0,160±0,003	0,095±0,007	0,123±0,026	0,133±0,025	0,135±0,018	

a, b, c – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

^{1, 2}- médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas (P<0,05)

Figura 3.22 – Resultados médios do teor de espermidina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Ao longo do processo de fabrico das linguiças verifica-se uma redução significativa dos teores desta poliamina durante a fase de fermentação (entre T1 e T2) que é comum às amostras dos dois ensaios. Esta diminuição pode resultar, como referido na parte teórica deste trabalho, da utilização desta poliamina como fonte de azoto pelos microrganismos (Bardócz, 1995).

A partir deste período, os teores de espermidina das amostras sem mistura aumentam significativamente durante a 1ª fase da secagem para valores estatisticamente semelhantes aos iniciais (T1), mantendo estes valores até ao fim do tempo de armazenamento.

Os teores de espermidina nas amostras com mistura, aumentam sempre a partir do final da fase de fermentação mas não de forma significativa (p>0,05).

De um maneira geral, e apesar de algumas oscilações durante o processo de fabrico, os teores de espermidina mantêm-se constantes nas amostras sem mistura e diminuem nas amostras com mistura.

Entre os dois ensaios só se encontram diferenças significativas ($p<0,05$) após 10 dias de fabrico e no produto final, com valores sempre superiores nas amostras sem mistura.

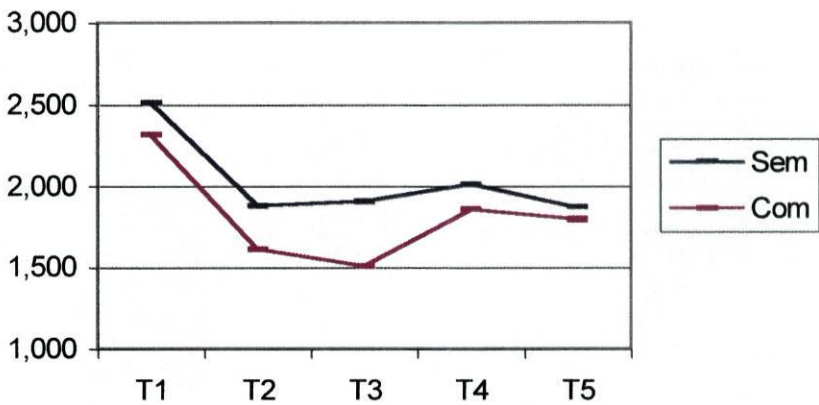
Os teores médios de espermina obtidos nos 5 tempos de fabrico / armazenamento e nos dois ensaios estudados são apresentados no quadro 3.17 e na figura 3.23.

Quadro 3.17 – Resultados médios do teor de espermina expressos em mg/100g de matéria seca (média \pm desvio padrão) nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo					Média
	T1	T2	T3	T4	T5	
Sem	2,508 \pm 0,140 ^{a1}	1,875 \pm 0,155 ^{b1}	1,904 \pm 0,105 ^{b1}	2,010 \pm 0,087 ^{b1}	1,869 \pm 0,163 ^{b1}	2,033 \pm 0,271
Com	2,315 \pm 0,099 ^{a1}	1,611 \pm 0,120 ^{bc1}	1,508 \pm 0,152 ^{c2}	1,855 \pm 0,175 ^{b1}	1,795 \pm 0,159 ^{b1}	1,817 \pm 0,311
Média	2,412 \pm 0,136	1,743 \pm 0,187	1,706 \pm 0,280	1,933 \pm 0,110	1,832 \pm 0,053	

^{a, b, c} – médias na mesma linha seguidas de letras diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)
^{1, 2} - médias na mesma coluna seguidas de números diferentes apresentam diferenças significativas ($P<0,05$)

Figura 3.23 – Resultados médios do teor de espermina expressos em mg/100g de matéria seca ao longo do fabrico / armazenamento de linguiça nos ensaios realizados sem e com mistura acidificante / antioxidante.



Tal como se verificou nos resultados da espermidina, e pelo mesmo motivo, também para a espermina se verifica uma redução significativa dos teores durante a fase de fermentação dos produtos.

A partir deste período, os teores de espermina mantêm-se constantes até ao final do período de armazenamento, nas amostras sem mistura. Nas outras amostras, verifica-se um incremento significativo dos teores de espermina durante a 2ª metade da fase de secagem, mantendo-se os teores constantes durante o armazenamento.

De uma maneira geral, e apesar de ocorrerem algumas oscilações durante o processo de fabrico, verifica-se uma diminuição significativa dos teores de espermina que é comum às amostras dos dois ensaios.

Entre os dois ensaios só se verificam diferenças significativas após 10 dias de fabrico com teores inferiores nas amostras com mistura, como se verifica também nos resultados da espermidina.

É de notar que, em termos médios, estas duas poliaminas apresentam teores mais elevados nas amostras sem mistura, que é precisamente o oposto do que se verificou para a generalidade das aminas biogénicas, com única excepção para a histamina.

A espermidina e a espermina têm sido referidas como aminas maioritárias na carne fresca (Bardócz, 1995; Halász *et al.* 1994; Hernández-Jover *et al.*, 1997a) sendo também encontradas em produtos cárneos (Cantoni, 1995; Hernández-Jover *et al.*, 1997a). No entanto, não existem muitos estudos sobre a sua evolução ao longo do fabrico de enchidos. Maijala *et al.* (1995), Paulsen e Bauer (1997) e Hernández-Jover *et al.* (1997b) referiram pequenas variações dos níveis destas poliaminas naturais em enchidos. Pelo contrário, Shalaby e Abd-el-Rahman (1995) não encontraram estas aminas durante a fermentação de enchidos.

Os resultados obtidos por Hernández-Jover *et al.* (1997b) referem uma redução dos teores de espermina e teores constantes de espermidina ao longo do fabrico. Tal também se verifica neste trabalho, com excepção para os resultados da espermidina nas amostras com mistura que diminuem. Bover-Cid *et al.* (1999b), referem teores de espermidina entre 0,4 e 0,6 mg/100g de matéria seca e teores de espermina entre 4,2 e 4,8 mg/100g de matéria seca. Resultados semelhantes a estes foram obtidos no produto final por Paulsen *et al.* (1997) referindo teores de espermidina de 0,3 mg/100g de matéria seca e teores de espermina de 3 mg/100g de matéria seca. Os resultados obtidos para estas poliaminas neste trabalho, revelam teores inferiores aos referidos anteriormente para qualquer uma das aminas, com teores médios a variarem entre $0,160 \pm 0,003$ e $0,133 \pm 0,025$ mg/100g de matéria seca para a espermidina e entre $2,412 \pm 0,136$ e $1,933 \pm 0,110$ mg/100g de matéria seca para a espermina. No entanto, a relação entre os teores de espermidina e

os teores de espermina são semelhantes, com valores superiores para esta última. Por esse motivo, os teores destas duas poliaminas apresentam uma correlação significativa ($R^2 = 0,9995$; $p = 0,020$).

3.3 – Níveis considerados tóxicos e Índice de Aminas Biogénicas

Como referido anteriormente, as aminas detectadas em maior concentração neste trabalho são, a putrescina, a cadaverina, a histamina e a tiramina. Destas aminas, só foram referidos limites tóxicos na bibliografia para a tiramina e para a histamina (Ten Brink *et al.*, 1990).

A tiramina apresenta valores máximos neste trabalho de 16,6 e 16,8 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura respectivamente.

De acordo com Maijala *et al.* (1995) a ingestão de alimentos com teores de tiramina entre 2,2 e 15 mg/100g de matéria seca pode desencadear efeitos tóxicos. Apesar da toxicidade da tiramina estar para além de qualquer dúvida, é muito difícil determinar o limite de toxicidade exacto deste composto em alimentos. A dose tóxica é fortemente dependente da eficiência da destoxificação, que pode ser diminuída pela presença de outras aminas, álcool e/ou drogas inibidoras das monoaminooxidases (Eerola *et al.*, 1997).

Como o nível máximo recomendado para a presença de tiramina em alimentos varia entre 10 e 80 mg/100g de produto, se considerarmos o limite inferior deste intervalo, os teores de tiramina obtidos neste trabalho podem ser considerados tóxicos, no entanto, estão muito afastados do limite superior do intervalo. De acordo com Edwards e Sandine (1981) citados por Eerola *et al.* (1997) a ingestão de teores de tiramina entre 1 e 10 mg pode induzir enxaquecas em indivíduos normais.

A histamina apresenta teores máximos de 9,5 e 10,0 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Estes teores, encontram-se muito próximo dos teores mínimos considerados tóxicos para esta amina (10 mg/100g) em alimentos.

A β -feniletilamina é outra das aminas para a qual existem limites tóxicos definidos, da ordem de 3 mg/100g. Os resultados obtidos neste trabalho são bastante inferiores, com teores máximos de 0,569 e 0,971 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura.

Apesar da putrescina e da cadaverina não serem consideradas tão tóxicas como as aminas anteriores, estas são precursoras, por reacção com o nitrito, de nitrosaminas carcinogénicas. Assim, os teores elevados destas aminas encontrados neste trabalho, devem ser vistos com alguma apreensão.

A putrescina apresenta teores máximos de 14,7 e 21,4 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Os teores máximos de cadaverina são 4,6 e 19,2 mg/100g de matéria seca nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Para estas aminas, as amostras dos dois ensaios apresentam teores máximos bastante afastados, sempre com teores mais elevados nas amostras com mistura.

O teor total máximo de aminas obtido nas amostras dos dois ensaios foi de 42,9 e 45,7 mg/100g de matéria seca, nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Estes teores são cerca de metade do considerado perigoso em alimentos (100 mg/100g).

O índice de aminas biogénicas proposto por Mietz e Karmas (1977) foi utilizado para caracterizar a qualidade microbiológica e comparar as amostras dos dois ensaios ao longo do tempo (quadro 3.18).

Quadro 3.18 – Resultados médios do índice de aminas biogénicas nos 5 tempos de fabrico / armazenamento.

Acid. / Antiox.	Tempo				
	T1	T2	T3	T4	T5
Sem	0,7	0,5	2,3	7,2	8,1
Com	0,2	0,6	4,7	11,8	13,7

Índices de aminas biogénicas inferiores a 1, que caracterizam produtos de boa qualidade microbiológica, só foram encontrados nos dois primeiros tempos de fabrico, durante o período que abrange a fase de fermentação dos enchidos, nos dois ensaios.

De acordo com Karmas (1981), produtos com índices de aminas biogénicas superiores a 10 caracterizam produtos fortemente contaminados. Apesar de se verificar um aumento dos índices de aminas biogénicas a partir dos 10 dias de fabrico até ao fim do período de armazenamento, as amostras sem mistura não apresentam índices superiores a 10. Pelo contrário, as amostras com mistura apresentam índices, no produto final e após armazenamento, de 11,8 e 13,7, respectivamente. Deste modo, a ingestão destas amostras, pode ser considerada como mais perigosa, tanto ao nível do desenvolvimento microbiano como ao nível dos efeitos tóxicos que pode originar, resultantes do seu teor elevado de aminas.

CONCLUSÕES

Parâmetros indicadores de estabilidade

As linguças processadas apresentaram valores de a_w e de pH que permitiam conservá-las, de forma estável, à temperatura ambiente. A estabilidade das amostras processadas sem introdução de mistura acidificante/antioxidante foi garantida pela acção conjunta da a_w ($0,92 \pm 0,04$) e do pH ($5,2 \pm 0,03$).

As amostras processadas com mistura acidificante/antioxidante apresentaram valores de a_w ($0,90 \pm 0,07$) que, por si só, permitiam a sua estabilidade à temperatura ambiente no final do tempo de fabrico e de armazenamento.

Ao longo do fabrico / armazenamento das amostras das 2 formulações, verificou-se uma redução da a_w que acompanhou a perda de humidade dos produtos até ao final do tempo de armazenamento, e que se mostrou mais acentuada durante a 2ª metade da fase de secagem (últimos 25 dias de fabrico).

O pH apresentou um comportamento semelhante ao longo do fabrico / armazenamento das amostras das duas formulações. Verificou-se uma redução característica do pH durante a fase de fermentação que se prolongou até ao fim da 1ª metade da fase de secagem (10 dias de fabrico), e um incremento gradual até ao fim do tempo de armazenamento, momento em que as amostras das duas formulações não se distinguiam (pH médio igual a 5,25).

Parâmetros indicadores de proteólise

O teor em azoto total (NT) manteve-se constante ao longo do processo de fabrico/armazenamento das linguças, apresentando valores médios de 6090 ± 124 e de 6125 ± 189 mg de N/100g expressas em matéria seca, nas amostras sem e com mistura acidificante/antioxidante, respectivamente.

O efeito da adição da mistura no teor de NT não se fez sentir em nenhum dos tempos estudados, o que era esperado porque as amostras dos dois ensaios foram processadas a partir da mesma matéria-prima de base.

O teor em azoto não proteico (NPN) e o índice de proteólise (IP) aumentam ligeiramente nas amostras sem mistura e mantêm-se relativamente constantes nas amostras com mistura ao longo do fabrico.

O NPN apresenta valores médios no produto final de 716 ± 52 e de 607 ± 43 mg de N/100g expressas em matéria seca, nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Os

resultados obtidos neste trabalho não revelam a existência de uma correlação significativa entre o NPN e o pH. No entanto, o NPN evolui no mesmo sentido do pH durante a 2ª metade da fase de secagem nas amostras sem mistura e durante o armazenamento nas amostras com mistura.

Em termos médios, as amostras com mistura apresentaram um índice de proteólise (IP) inferior ($9,88 \pm 0,67 \%$) às amostras sem mistura ($10,67 \pm 0,82\%$), o que se pode justificar pela presença de uma microflora com actividade proteolítica menos intensa.

O tempo correlaciona-se de forma altamente significativa ($R^2 = 0,6869$) com o teor de aminoácidos livres (AA). Este aumenta, durante toda a fase de secagem nas amostras sem mistura e apenas na 1ª fase deste processo nas amostras com mistura, e diminui no período de armazenamento para os dois ensaios.

As amostras sem e com mistura distinguem-se significativamente ($p < 0,05$) no teor de AA aos 3 dias, após mistura da massa, e no fim do armazenamento, com teores sempre inferiores para as amostras com mistura, de 136 ± 18 mg de N/100g de matéria seca contra 181 ± 20 mg de N/100g de matéria seca e de 217 ± 30 mg de N/100g de matéria seca contra 275 ± 22 mg de N/100g de matéria seca, respectivamente.

O teor de aminoácidos livres expresso em percentagem de azoto não proteico (AA/NPN) para as amostras das duas formulações, aumentou 10,7% na 1ª metade da fase de secagem e 11% na 2ª metade, apresentando uma descida de 11,6% durante o armazenamento.

Os resultados obtidos neste trabalho para a percentagem de AA/NPN estão de acordo com os obtidos por Demeyer (1992), que verificou um aumento desta percentagem até ao produto final, obtendo um valor de 44,1%, ligeiramente inferior à média dos dois ensaios em T4 ($48,4 \pm 1,1\%$).

Aminas biogénicas e poliaminas naturais

A técnica implementada e validade para a detecção/quantificação simultânea de 8 aminas em enchidos parece ser adequada para o controlo de qualidade destes produtos. Permite a quantificação das aminas minoritárias desta matriz, com sensibilidade suficiente para detectar pequenas variações nos seus teores em intervalos de tempo de fabrico relativamente reduzidos.

A optimização do processo de extracção, com a utilização de um reagente de par iónico (BEHPA) para a purificação da matriz, permitiu a obtenção de cromatogramas relativamente limpos de substâncias interferentes, o que é especialmente vantajoso quando se pretende quantificar várias aminas em simultâneo numa matriz complexa, como acontece neste trabalho.

Verificou-se que as repetições do mesmo fabrico apresentaram uma certa variação no teor em aminas. Esta variação é descrita por diversos autores e resulta da heterogeneidade do produto

e da microflora espontânea produtora de aminas. As diferenças encontradas originaram um desvio padrão relativamente alto. Para que os resultados tivessem validade estatística foram analisadas 5 repetições de cada fabrico e tempos estudados.

Verificou-se um aumento do teor total de aminas ao longo do fabrico que é mais acentuado nas amostras com mistura acidificante/antioxidante. De uma maneira geral, verificaram-se dois grupos quantitativos de aminas. Um grupo de aminas maioritárias: a tiramina, a putrescina, a histamina e a cadaverina, com teores médios no produto final de $14,870 \pm 1,224$, $17,970 \pm 4,670$, $9,742 \pm 0,400$ e $5,707 \pm 3,936$ mg/100g expressos em matéria seca, respectivamente. Um grupo de aminas minoritárias: a triptamina, a espermidina, a β -feniletilamina e a espermina, com teores médios no produto final de $2,063 \pm 0,856$, $1,933 \pm 0,110$, $0,611 \pm 0,059$ e $0,133 \pm 0,025$ mg/100g expressos em matéria seca, respectivamente.

O teor total de aminas observado em cada tempo estudado foi muito semelhante nas amostras das duas formulações. A única excepção verificou-se 3 dias após mistura da massa, momento em que as amostras sem mistura acidificante/antioxidante apresentam um teor total de aminas 3,4 vezes superior. O teor total médio de aminas aumentou 5,8 vezes durante o fabrico das linguiças até ao produto final e diminuiu ligeiramente durante o armazenamento.

Ao longo do tempo não se verificou uma correlação significativa ($p > 0,05$) entre o pH e o teor total de aminas. No entanto, o teor total de aminas aumenta de forma mais marcada durante a fase de secagem, quando o pH sobe e se encontra entre 5,0 e 5,2.

Após 3 dias de repouso da massa, as amostras com mistura têm um teor total de aminas mais baixo porque a queda brusca de pH que ocorre nestas amostras durante o repouso da massa, por influência da GDL, pode dificultar o crescimento de certos microrganismos e levar à destruição de outros com actividade aminoácido-descarboxilase. A maior produção de aminas, que se verifica durante a fase de secagem e o armazenamento destas amostras, comparativamente às amostras sem mistura, pode então resultar do mecanismo de defesa dos microrganismos contra ambientes ácidos, ou da actividade aminoácido-decarboxilásica dos microrganismos que sobrevivem à queda inicial do pH como as bactérias lácticas.

A GDL não parece ser um bom substituto das culturas iniciadoras ao nível da produção de aminas biogénicas, já que, de uma maneira geral, se verifica um incremento dos seus teores com a introdução deste aditivo. Isto acontece, muito provavelmente porque, mais importante do que fazer baixar o pH para destruir a microflora contaminante produtora de aminas, é importante conhecer a capacidade da microflora láctica para produzir estes compostos, já que, com ou sem GDL, estes microrganismos ocorrem maioritariamente em enchidos secos fermentados de forma natural, ou por introdução. Assim, não basta trabalhar com matérias-primas de boa qualidade e

em condições higio-sanitárias adequadas, por forma a evitar a contaminação dos produtos durante o processamento e armazenamento, para evitar a produção de aminas biogénicas em enchidos secos curados, embora estas condições possam ser suficientes para baixar a produção de aminas a níveis considerados não tóxicos.

Os teores de tiramina encontrados neste trabalho, nas amostras das duas formulações, no produto final e após armazenamento, são considerados tóxicos. Os produtos finais de ambas as formulações apresentam teores muito próximos do mínimo considerado tóxico para a histamina. Verificaram-se teores elevados de putrescina e de cadaverina no produto final, teores estes que aumentam durante o armazenamento. Estes teores devem ser vistos com apreensão porque estas aminas são precursoras de nitrosaminas.

O teor total máximo de aminas nas amostras dos dois ensaios foi obtido no produto final e foi de 42,9 e 45,7 mg/100g expresso em matéria seca, nas amostras sem e com mistura, respectivamente. Estes teores são cerca de metade do considerado perigoso em alimentos. No entanto, considerando um índice de aminas biogénicas superior a 10 como característico de produtos fortemente contaminados, a ingestão das amostras com mistura acidificante/antioxidante pode ser considerada toxicologicamente perigosa.

BIBLIOGRAFIA

- A.O.A.C., 1975. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. (13th ed.). Washington, D.C.
- A.O.A.C., 1990. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. (15th ed.). Washington, D.C.
- Ababouch, L.; M. E. Afilal & H. Benabdeljelil, 1991. Quantitative changes in bacteria, amino acids and biogenic amines in sardine (*Sardina pilchardus*) stored at ambient temperature (25-28°C) and in ice. International Journal of Food Science and Technology, 26: 297-306.
- Andersen, S. J., 1992. Changes in the mycoflora during ripening of naturally mould-fermented sausages. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France: 767-770.
- Antolini, F.; S. Franciosini; AL. Floridi & A. Floridi, 1999. Na ion pair HPLC method for the determination of histamine, tyramine, tryptamine, β -phenylethylamine and their amino acid precursors in cheeses for industrial purposes. Ital. J. Food Sci., N°4, Vol. 11: 335-345.
- Arlorio, M.; J.D. Coisson & A. Martelli, 1999. Extraction methods for biogenic amines in wine and beer. Ital. J. Food Sci., N°4, Vol. 11: 355-361.
- Armas, R.; M. Martinez; C. Vicente & M.E. Legaz, 1999. Free and conjugated polyamines and phenols in raw and alkaline-clarified sugarcane juices. J. Agric. Food Chem., 47: 3086-3092.
- Ayan, K.; N. Kolsarici & G. A. Ozkan, 1999. The effects of a starter culture on the formation of biogenic amines in Turkish soudjoucks. Meat Science, 53: 183-188.
- Baráth, A. & A. Halász, 1995. Indication of pork meat freshness by its biogenic amine composition. Eurofood Chem. VIII, Viena. 313-318 pp.
- Bardócz, S., 1999. Role of biogenic amines – summing up or what is it we do not know? Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol III, Part I: 1 – 4 pp.
- Bauer, F.; I. Seuss; P. Paulsen & S. VALI, 1994. The formation of biogenic amines in meat and meat products. Proceedings of the 40th International Congress of Meat Science and Technology, The Hague, The Netherlands. S-V:25.
- Bello, J. & M. A. Sanchez-Fuertes, 1997. Development of mathematical model to describe the acidification occurring during the ripening of dry fermented sausage. Food Chemistry, Vol. 59, N° 1: 101-105.
- Binstok, G.; C. Campos & L. Gerschenson, 1996. Determination of nitrites in meat systems: an improved procedure. Meat Science, Vol. 42, N°4: 401-405.

- Bockhardt, A.; I. Krause & H. Klostermeyer, 1996. Determination of biogenic amines by RP-HPLC of the dabsyl derivatives. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 203: 65-70.
- Bodmer, S.; C. Imark & M. Kneubuhl, 2000. Low-histamine technology, the genuine way to avoid histamine-intolerance. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol IV, Part I*: 35 – 40 pp.
- Bohme, H. M.; F. D. Mellett; L. M. T. Dicks & D. S. Basson, 1996. Production of Salami from Ostrich Meat with Strains of *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* and *Micrococcus sp.* *Meat Science*, Vol. 44, Nº.3: 173-180.
- Borpuzari, R. & K. Boschkova, 1993. Nitrate reductase activity of *Micrococcaceae* isolated from bulgarian raw-dried sausage. 39th International Congress of Meat Science and Technology, Calgary, Canada. S6P02.WP.
- Bover-Cid, S. & W. Holzapfel, 2000. Biogenic amine production by bacteria. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol IV, Part I*: 20 – 29 pp.
- Bover-Cid, S.; M. Izquierdo-Pulido & M. C. Vidal-Carou, 1999b. Effect of proteolytic starter cultures of staphylococcus spp. on biogenic amine formation during the ripening of dry fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 45-104.
- Bover-Cid, S.; M. Izquierdo-Pulido, M.T. Veciana-Nogués; A. Mariné-Font & M.C. Vidal-Carou, 1999c. Relationship between biogenic amine content and the size of dry fermented sausages. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol III, Part I*: 28 – 35 pp.
- Bover-Cid, S.; S. Schoppen; M. Izquierdo-Pulido & M. C. Vidal-Carou, 1999a. Relationship between biogenic amine contents and the size of dry fermented sausages. *Meat Science*, 51: 305-311.
- Bover-Cid, S.; W. Holzapfel; M. Izquierdo-Pulido; M.C. Vidal-Carou & A. Mariné-Font, 2000. Production of fermented sausages with low biogenic amine levels. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol IV, Part I*: 41 – 48 pp.
- Buncic, S.; L. Paunovic, V. Teodorovic; D. Radisic, G. Vojinovic, D. Smiljanic & M. Baltic, 1993. Effects of gluconodeltalactone and *Lactobacillus plantarum* on the production of histamine and tyramine in fermented sausages. *International Journal of Food Microbiology*, 17: 303-309.
- Butturini, A.; P. Aloisi; R. Tagliazucchi & C. Cantoni, 1995. Production of biogenic amines by enterobacteria and lactic acid bacteria isolated from meat products. *Industrie Alimentari*, 34: 105-107.
- Calhau, L.; D. Santos & M. Barbosa, 1999. Determinação de aminas biogénicas em queijo Serpa por HPLC. 4º Encontro de Química dos Alimentos. 259-261 pp.

- Campos, L.S., 1998. Aminoácidos e proteínas - estruturas e propriedades. *In: Entender a Bioquímica. O metabolismo fundamental em animais e plantas.* Editora Escolar. 75-127 pp.
- Cantoni, C., 1995. Amines in Italian meat products. *Industrie Alimentari*, 34: 9-12.
- Carlucci, F.V. & E. Karmas, 1988. Liquid chromatographic determination of some amines and their amino acid precursors in protein foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, Vol. 71; Nº3: 564-568.
- Chang, S-F.; J. W. Ayres & W. E. Sandine, 1985. Analysis of cheese for histamine, tyramine, tryptamine, histidine, tyrosine, and tryptophane. *J. Dairy Sci.* 68: 2840-2846.
- Chasco, J.; G. Lizaso & M. J. Beriain, 1996. Cured colour development during sausage processing. *Meat Science*, Vol. 44, Nº.3: 203-211.
- Coretti, K., 1971. Fabricación de embutidos crudos y procesos que tienen lugar en la maduración normal de los mismos. *In: Embutidos: elaboración y defectos.* Editorial Acribia.
- Crespo, F.L.; B.A. Sánchez; J.C.P. Padrón; F.B. Heredia; C.M. Moreno; E.M. Pérez-Barquero & C. Martins, 1985. Proteolisis y lipolisis en la maduración del chorizo (a). *Alimentaria*, Junio, Nº. 163, 51-53.
- Crespo, L.F., 1982. Las nuevas disposiciones legislativas sobre productos cárnicos. *Alimentaria* (145): 45-48.
- Decreto-Lei 363/98 de 19 de Novembro de 1998 relativo aos aditivos alimentares com excepção dos corantes e dos edulcorantes.
- DeMasi, T.W., 1990. Nonprotein nitrogen (NPN) and free amino acid contents of dry, fermented and nonfermented sausages. *Meat Science*, 27: 1-12.
- Demeyer, D. I., 1992. Meat Fermentation as an Integrated Process. *In: New Technologies for Meat and Meat Products.* Edited By Frans. J. M. Smulders, Fidel Toldrá, José Flores and Miguel Prieto, Edeamst, Audet Tijdschriften, The Netherlands: 21 - 33.
- Díaz, O.; M. Fernandez; E. Hierro; G. D. Garcia de Fernando; L. Hoz & J. A. Ordoñez, 1995. Modificaciones de las proteínas durante la maduración de los embutidos. *Alimentacion, Equipos y Tecnología* – Abril: 113-118.
- Díaz, O.; M. Fernandez; G.D. Garcia De Fernando; L. Hoz & J.A. Ordóñez, 1996. Effect of the addition of papain on the dry fermented sausage proteolysis. *J. Sci. Food Agric.*, 71: 13-21.
- Dierick, N.; P. Vandekerckhove & D. Demeyer, 1974. Changes in nonprotein nitrogen compounds during dry sausages ripening. *Journal of Food Science*, Vol. 39: 301-304.

- Duflos, G.; C. Dervin; P. Malle & S. Bouquelet, 1999. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in Plaice (*Pleuronectes platessa*) and Whiting (*Merlangus merlangus*). Journal of AOAC International, Vol. 82, Nº5: 1097-1101.
- Eerola, S. & R. Maijala, 1999. Biogenic amines in dry sausages: factors affecting the formation during fermentation. Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol III, Part I: 20 – 27 pp.
- Eerola, S.; A. X. Roig-Sagués; L. Lilleberg & H. Aalto, 1997. Biogenic amines in dry sausages during shelf-life storage. Z. Lebensm. Unters. Forsch. A., 205: 351-355.
- Eerola, S.; I. Otegui; L. Saari & A. Rizzo, 1998. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry and tandem mass spectrometry to the determination of volatile nitrosamines in dry sausages. Food Additives and Contaminants, Vol. 15, Nº 3: 270-279.
- Eerola, S.; R. Hinkkanen; E. Lidfors & T. Hirvi, 1993. Liquid chromatographic determination of biogenic amines in dry sausages. J. of AOAC International, Vol. 76, Nº3: 575-577.
- Eerola, S.; R. Maijala & P. Hill, 1992. The influence of nitrite on the formation of biogenic amines in dry sausages. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France: 783-786.
- Eerola, S.; R. Maijala; A. X. Roig-Sagués; M. Salminen & T. Hirvi, 1996. Biogenic amines in dry sausages as affected by starter culture and contaminant amine-positive *Lactobacillus*. Journal of Food Science, Vol. 61, Nº 6: 1243-1246.
- Eitenmiller, R. R.; P. E. Koehler & J. O. Reagan, 1978. Tyramine in fermented sausages: factors affecting formation of tyramine and tyrosine decarboxylase. Journal of Food Science, Vol. 43: 689-693.
- Esteves, A.; M.E. Espinheira; C. Saraiva & C. Martins, 1999. Avaliação da qualidade higio-sanitária de linguiça. 4º Encontro de Química de Alimentos. Coimbra: 159-161.
- Fernandes, J.O. & M.A. Ferreira, 2000a. Determination of histamine in Port wines and grape juices by ion-pair extraction and stable isotope dilution GC-MS. Chromatographia, Vol. 52, Nº1/2, July: 77-81.
- Fernandes, J.O. & M.A. Ferreira, 2000b. Combined ion-pair extraction and gas chromatography-mass spectrometry for the simultaneous determination of diamines, polyamines and aromatic amines in Port wine and grape juice. Journal of Chromatography A, 886: 183-195.
- Freitas, A.; I. Patarata & C. Martins, 1992. Avaliação do teor em nitrito e nitrato em produtos de salsicharia. Veterinária Técnica. Dez. 20-23 pp.

- Frey, W., 1983. Embutidos crudos consistentes. *In: Fabricacion fiable de embutidos*. Editorial Acribia, S.A. 1-46 pp.
- Frouin, A.; F. Lacour; J. Bazile; J-P. Bidard & D. Jondeau, 1981. Étude de relations entre le blocage du nitrite et la production de nitrosamines et tentative d'explication. 27^e Euro. Fleisch Kongress Vien, D: 28, 476-479.
- Galvão, C., 1991. The pork meat industry in Portugal. African swine fever workshop proceeding – Community programme for coordination of agriculture research, Lisbon.
- Gauthier, M.; F. Bolnot; J. Rozier & V. Carlier, 1986. Activité de l'eau et conservation des denrées alimentaires. RTVA (9): 16-21.
- Geisen, R.; F. K. Luche & L. Krockel, 1992. Starter and protective cultures for meat and meat products. *Fleischwirtsch*, 72(6): 894 - 898.
- Gennaro, M.C.; D. Giacosa; C. Abrigo; P. Biglino & E. campi, 1996. Organic Bases. *In: Handbook of Food Analysis*. Vol. I. Edited by Leo M.L. Mollet. Marcel Dekker, Inc. 745-819 pp.
- Girard, J. P. & C. Bucharles, 1991. La Acidificacion. *In: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. J. P. Girard. Editorial Acribia. 151 - 177 pp.
- Girard, J. P., 1991a. El Ahumado. *In: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. J. P. Girard. Editorial Acribia. 183 - 224 pp.
- Girard, J. P., 1991b. La Deshidratacion. *In: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. J. P. Girard. Editorial Acribia. 89 - 110 pp.
- Gou, P.; L. Guerrero; J. Gelabert & J. Arnau, 1996. Potassium Chloride, Potassium Lactate and Glycine as Sodium Chloride Substitutes in Fermented Sausages and Dry-Cured Pork Loin. *Meat Science*, Vol. 42, N°1: 37-48.
- Goutefongea, R., 1991. La Salazon. *In: Tecnología de la carne y de los productos cárnicos*. J. P. Girard. Editorial Acribia. 125 - 144 pp.
- Hagen, B.F.; J-L. Berdagué; A.L. Holck; H. Naes & H. Blom, 1996. Bacterial proteinase reduces maturation time of dry fermented sausages. *Journal of Food Science*, Vol. 61, N°5: 1024-1029.
- Halász, A. & Á Baráth, 1998. Biogenic amines: the chemical compounds of special biological activity. Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol II. Part I: 1-7 pp.
- Halász, A.; Á. Baráth; L. Simon-Sarkadi & W. Holzapfel, 1994. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Trends in Food Science & Technology*, 51: 42-49.
- Halliday, D. A., 1969. Comminuted pork products. *Process Biochemistry*, August: 57-62.

- Hernández-Jover, T., M. Izquierdo-Pulido, A. Mariné-Font & M. C. Vidal-Carou, 1995. Determination of biogenic amines in meat products by a liquid chromatographic method. *Euro Food Chem VIII*, Vol. 2: 371-381.
- Hernández-Jover, T., M. Izquierdo-Pulido, M. T. Veciana-Nogués, A. Mariné-Font & M. C. Vidal-Carou, 1997b. Effect of starter cultures on biogenic amine formation during fermented sausage production. *Journal of Food Protection*, Vol. 60, Nº 7: 825-830.
- Hernández-Jover, T.; M. Izquierdo-Pulido; M. V. Veciana-Nogués & M. C. Vidal-Carou, 1996. Biogenic amines sources in cooked cured shoulder pork. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 44: 3097-3101.
- Hernández-Jover, T.; M. Izquierdo-Pulido; M.T. Veciana-Nogués; A. Mariné-Font & M.C. Vidal-Carou, 1997a. Biogenic amine and polyamine contents in meat and meat products. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 2098-2102.
- Hornero-Méndez, D. & A. Garrido-Fernández, 1994. Biogenic amines in table olives. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Analyst*, September, Vol. 119: 2037-2041.
- Huang, C. & C. Lin, 1993. Drying temperature and time affect quality of chinese-style sausage inoculated with lactic acid bacteria. *Journal of Food Science*, Vol. 58, Nº.2: 249-253.
- Hugas, M. & J. M. Monfort, 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. *Food Chemistry*, Vol. 59, Nº 4: 547-554.
- Hugas, M.; M. Garriga & J. M. Monfort, 1992. Developing microbial cultures as starters for meat processing. *In: New Technologies for Meat and Meat Products*. Ed. By Frans. J. M. Smulders, Fidel Toldrá, José Flores and Miguel Prieto, *Ecceamst*, Audet Tijdschriften, The Netherlands: 71 - 90.
- Hwang, D-F; S-H. Chang; C-Y. Shiua & T-J. Chai, 1997. High-performance liquid chromatographic determination of biogenic amines in fish implicated in food poisoning. *Journal of Chromatography B*; 693: 23-30.
- Izquierdo-Pulido, L.; M.C. Vidal-Carou & A. Marine-Font, 1993. Determination of biogenic amines in beers and their raw materials by ion-pair liquid chromatography with post column derivatization. *Journal of AOAC International*. Vol. 76, Nº5: 1027-1032.
- Janeiro, J. P., 1948. *Noções de Salsicharia*. 1ª Parte. Generalidades - Instalações, Matérias Primas. Biblioteca Rural. Publicada sob a Direcção do Eng. Agrónomo Luís Quartin Graça. Livraria Luso-Espanhola, Lda. Lisboa.
- Jarisch, R., 2000. Histamine intolerance (HIT) – na overlooked disease. *Cost 917 – Biogenically active amines in food*. Vol IV, Part I: 30 – 34 pp.

- Joosten, H.M.L.J. & C. Olieman, 1986. Determination of biogenic amines in cheese and some other food products by high-performance liquid chromatography in combination with thermo-sensitized reaction detection. *Journal of Chromatography*, 356: 311-319.
- Kalac, P.; J. Spicka; M. Krizek; S. Steidlová & T. Pelikánová, 1999. Concentrations of seven biogenic amines in sauerkraut. *Food Chemistry*, 67: 275-280.
- Kalligas, G.; I. Kaniou; G. Zachariadis; H. Tsoukali & P. Epivatianos, 1994. Thin layer and high pressure liquid chromatographic determination of histamine in fish tissues. *Journal of Liquid Chromatography*, 17(11): 2457-2468.
- Kanny, G., 1999. Role of biogenic amines in food intolerance: study of histamine metabolism in food histamine intake models. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol III, Part I: 64 – 72 pp.*
- Karmas, E., 1981. Biogenic amines as indicators of seafood freshness. *Food Science Technology*, 17: 20-23.
- Kirschbaum, J.; B. Luckas & W.D. Beinert, 1994. Pre-column derivatization of biogenic amines and amino acids with 9-fluorenylmethyl chloroformate and heptylamine. *Journal of Chromatography A*, 661: 193-199.
- Klettner, P. G. & P. A. Baumgartner, 1980. The technology of raw dry sausage manufacture. *Food Technology in Australia*, Vol. 32(8): 380 - 384.
- Kottke, V.; H. Damm; A. Fischer & U. Leutz, 1996. Engineering aspects in fermentation of meat products. *Meat Science*, Vol. 43, N°S: S243 - S255.
- Kranner, P.; F. Bauer & E. Hellwig, 1991a. Investigations of the formation of histamine in foods and foods poisoning caused by histamine. *Die Nahrung*, 15: 109-113.
- Kranner, P.; F. Bauer & E. Hellwig, 1991b. Investigations on the formation of histamine in raw sausages. 37th International Congress of Meat Science and Technology. Kulmbach, Germany; 889-891.
- Krause, I.; A. Bockhardt; H. Neckermann; T. Henle & H. Klostermeyer, 1995. Simultaneous determination of amino acids and biogenic amines by reversed-phase high-performance liquid chromatography of the dansyl derivatives. *Journal of Chromatography A*, 715: 67-79.
- Lago, J. L. V., 1997. Tecnología de los embutidos curados. *Cienc.Tecnol.Aliment.*, Vol. 1, N°5: 129-133.
- Lakritz, L.; A.M. Spinelli & A.E. Wasseiman, 1976. Effect of storage on the concentration of proline and other free amino acids in pork bellies. *Journal of Food Science*. Vol. 41: 879-881.

- Leistner, F., 1992. The enzymology of dry-curing of meat products. *In: New Technologies for meat and meat products*. Edited by F. J. M. Smulders, F. Toldrá, J. Flores e M. Prieto. Ecceamst. 1 - 11 pp.
- Leistner, F., W. Rodel & K. Kispian, 1981. Microbiology of meat and meat products. *In: High- and intermediate moisture ranges. In water activity: Influences on food quality. A treatise on the influence of bound and free water on the quality and stability of foods and other natural products*. Edited by B. Rockland & G. F. Stewart. Academic press: 855-916 pp.
- Leistner, L. & W. Rodel, 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to microorganisms in intermediate moisture foods. Ed. R. Davies, G.G. Birch and K.J. Parker. Applied Science Publishers Ltd., London. 120-137 pp.
- Leistner, L. 1990. Fermented and intermediate moisture foods. 36th International Congress of Meat Science and Technology, Cuba (3): 842-851.
- Leuschner, R., M. Heidel & W. P. Hammes, 1998. Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 1-10.
- Leuschner, R.G.K. & W.P.Hammer, 1998. Tyramine degradation by *Micrococci* during ripening of fermented sausage. *Meat Science*. Vol. 49, N°3: 289-296.
- Linares, R.M.; J.H. Ayala; A.M. Afonso & V.G. Díaz, 1998. Rapid microwave-assisted dansylation of biogenic amines. Analysis by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 808: 87-93.
- Lois, A.L.; L.M. Gutiérrez ; J.M. Zumalacárregui & A. López, 1987. Changes in several constituents during the ripening of "chorizo" – a spanish dry sausage. *Meat Science*, 19: 169-177.
- Lortzing, S. O., 1996. Productos curados de larga duración. *In: Elaboración casera de carne y embutidos*. Edited by Schiffner, Oppel, Lortzing. Editorial Acribia, S.A. 193 - 207 pp.
- Lucke, F.-K., 1985. Fermented sausages. *In: Microbiology of fermented foods*. 2, Edited by B. J. B. Wood. Elsevier applied science publishers. New York, USA: 41-83 pp.
- Maijala, R. & S. Eerola, 1993. Contaminant lactic acid bacteria of dry sausages produce histamine and tyramine. *Meat Science*, Vol. 35: 387-395.
- Maijala, R. L., 1993. Formation of histamine and tyramine by some lactic acid bacteria in MRS - broth and modified decarboxylation agar. *Letters in Applied Microbiology* 17: 40-43.
- Maijala, R. L.; S. H. Eerola; M. A. Aho & J. A. Hirn, 1993b. The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat. *Journal of Food Protection*, Vol. 56, N°2: 125-129.

- Maijala, R., 1994a. Formation of biogenic amines in dry sausages with special reference to raw materials, lactic acid bacteria, pH decrease, temperature and time. *In: Academic dissertation, Helsinki.*
- Maijala, R., 1994b. Histamine and tyramine production by a *Lactobacillus* strain subjected to external pH decrease. *Journal of Food Protection*, Vol. 57, N° 3: 259-262.
- Maijala, R.; E. Nurmi & A. Fischer, 1994. Influence of processing temperature on the formation of biogenic amines in dry sausages. *In: Formation of biogenic amines in dry sausages. With special reference to raw materials, lactic acid bacteria, pH decrease, temperature and time. Riitta Maijala. Academic dissertation. Helsinki.*
- Maijala, R.; S. Eerola; P. Hill & E. Nurmi, 1993a. The influence of some starter cultures and GDL on the formation of biogenic amines in dry sausages. *Agric. Sci. Finl.*, 2: 403-412 pp.
- Maijala, R.; S. Eerola; S. Lievonon; P. Hill & T. Hirvi, 1995. Formation of biogenic amines during ripening of dry sausages as affected by starter culture and thawing time of raw materials. *Journal of Food Science*, Vol. 60, N° 6: 1187-1190.
- Malle, P. & M. Vallé, 1996. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. *Journal of AOAC International*. Vol. 79, N°1: 43-49.
- Marchesini, B.; A. Bruttin; N. Romailier; R. S. Moreton; C. Stucchi & T. Sozzi, 1992. Microbiological events during commercial meat fermentations. *Journal of Applied Bacteriology*, 73: 203-209.
- Mares, A.; K. Neyts & J. Debevere, 1994. Influence of pH, salt and nitrite on the heme-dependent catalase activity of lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 24: 191-198.
- Mariné-Font, A.; C. Vidal-Carou; M. Izquierdo-Pulido; T. Veciana-Nogués & T. Hernández-Jover, 1995. Les amines biogènes dans les aliments: leur signification, leur analyse. *Ann. Fals. Exp. Chim. – Avril-Mai-Juin*. Vol. 88, N° 931: 119-140.
- Masson, F. & M. C. Montel, 1995. Revue: Les amines biogènes dans les produits carnés. *Viandes Prod. Carnés*, Vol. 16(1): 3-7.
- Masson, F. & M. C. Montel, 1996. Amine Production in Meat Fermentation. A. *In vitro* amine production by microorganisms. *In: European AIR Project. AIR 2-CT94-1517. Optimisation of endogenous and bacterial metabolism of the improvement of safety and quality of fermented meat products. Proceedings of a workshop at the 42nd International Congress of Meat Science and Technology edited by M. Raemaekers, D. Demeyer. Lillehammer, September 1: 19-21.*

- Masson, F., 1998. Les Amines Biogènes. *In*: Catabolisme des acides aminés par les ferments bactériens du saucisson. Tese de Doutoramento. Université Blaise Pascal. Station de Recherches sur la Viande – Unité de Recherches de Microbiologie. Institut National de la Recherche Agronomique – Clermont-Ferrand-Theix.
- Masson, F., L. Eclache; T. Compte; R. Talon & M. C. Montel, 1996a. Qui produit des amines biogènes dans les produits carnés? *Viandes Prod. Carnés*, Vol. 17(6): 287-289.
- Masson, F.; G. Johansson & M. C. Montel, 1997a. Les souches bactériennes risquent-elles de produire des amines dans les produits carnés? *Coll. Soc. Microbiol./Alim.*, Vol. 11: 149-155.
- Masson, F.; G. Johansson & M.C. Montel, 1999. Tyramine production by a strain of *Carnobacterium divergens* inoculated in meat – fat mixture. *Meat Science* 52: 65-69.
- Masson, F.; L. Eclache; T. Compte; R. Talon & M. C. Montel, 1996c. Screening of microbial strains producing amines and isolated from meat products. 42nd International Congress of Meat Science and Technology, Lillehammer: 546-547.
- Masson, F.; R. Talon & M. C. Montel, 1996b. Histamine and tyramine production by bacteria from meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 32: 199-207.
- Masson, F; A. Lebert, R. Talon & M. C. Montel, 1997b. Effects of physico-chemical factors influencing tyramine production by *Carnobacterium divergens*. *Journal of Applied Microbiology*, 83: 36-42.
- Mateo, J. & J. M. Zumalacárregui, 1996. Volatile compounds in chorizo and their changes during ripening. *Meat Science*, Vol. 44, N°4: 255-273.
- Mentasti, E.; C. Sarzanini; O. Abollino & V. Porta, 1991. Chromatographic behaviour of homologous amines: comparison of derivatizing agents, columns and mobile phases. *Chromatographia*, Vol.31, N°1/2, January: 41-49.
- Mietz, J.L. & E. Karmas, 1977. Chemical quality index of canned tuna as determined by high-pressure liquid chromatography. *Journal of Food Science*. Vol. 42: 155-158.
- Molly, K. & I. Geenen, 1996. Amine Production in Meat Fermentation. D. Comparison of amine production between *Carnobacterium divergens* and *Lactobacillus sake* in dry sausages. *In*: European AIR Project. AIR 2–CT94–1517. Optimisation of endogenous and bacterial metabolism of the improvement of safety and quality of fermented meat products. Proceedings of a workshop at the 42nd International Congress of Meat Science and Technology edited by M. Raemaekers, D. Demeyer. Lillehammer, September 1: 29-30.
- Montel, M.; G. Johansson; A. Lebert; F. Masson, K. Molly & I. Geenen, 1996. Amine Production in Meat Fermentation. *In*: European AIR Project. AIR 2–CT94–1517. Optimisation of endogenous and bacterial metabolism of the improvement of safety and

- quality of fermented meat products. Proceedings of a workshop at the 42nd International Congress of Meat Science and Technology edited by M. Raemaekers, D. Demeyer. Lillehammer, September 1: 18-19.
- Moret, S. & L.S. Conte, 1996. High-performance liquid chromatographic evaluation of biogenic amines in foods. Na analysis of different methods of sample preparation in relation to food characteristics. *Journal of Chromatography A*, 729: 363-369.
- Moret, S.; L. Conte & F. Callegarin, 1996b. La determinazione delle amine biogene in prodotti ittici e carni conservati. *Industrie Alimentari – XXXV – Giugno*: 650-657.
- Moret, S.; L.S. Conte & E. Spoto, 1996a. Presenza delle amine biogene nei formaggi – fattori che ne influenzano le determinazioni analitiche. *Industrie Alimentari – XXXV – Luglio-Agosto*: 788-792.
- Moret, S.; R. Bortolomeazzi & G. Lercker, 1992. Improvement of extraction procedure for biogenic amines in food and their high-performance liquid chromatographic determination. *Journal of Chromatography*, 591: 175-180.
- Morgan, D.M.L., 1998. Amine oxidases. *Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol II, Part II*: 48 – 63 pp.
- Morley, J.; L. Elrod Jr.; C. Linton; D. Shaffer & S. Krogh, 1997. Determination of residual amines used in bulk drug synthesis by pre-column derivatization with 3,5-dinitrobenzoyl chloride and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 766: 77-83.
- Naguib, K.; A.M. Ayesh & A.R. Shalaby, 1995. Studies on the determination of biogenic amines in foods. 1. Development of a TLC method for the determination of eight biogenic amines in fish. *J. Agri. Food Chem.* 43: 134-139.
- Niven, J. R. C. F., 1994. Microbiología y parasitología de la carne. *In: Ciencia de la carne y de los productos carnicos. J. F. Price y B. S. Schweigert. Acibia, S.A.* 199 - 237 pp.
- NP1612: 1979 Ed. 1 (1^a edição). Norma portuguesa. Carnes, derivados e produtos cárneos. Determinação do teor de azoto total.
- NP588: 1983 Ed. 2 (2^a edição) pp. 1 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a carnes preparadas, enchidos e ensacados.
- NP589: 1987 Ed. 2 (2^a edição) pp. 6 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Chouriço de carne.
- NP590: 1989 Ed. 2 (2^a edição) pp. 6 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Linguça.
- NP591: 1969 Ed. 1 (1^a edição) pp. 2 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Salpicão.

- NP592: 1969 Ed. 1 (1ª edição) pp. 2 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Paio.
- NP593: 1990 Ed. 2 (2ª edição) pp. 4 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Morcela.
- NP594: 1990 Ed. 2 (2ª edição) pp. 3 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Chouriço de sangue.
- NP595: 1990 Ed. 2 (2ª edição) pp. 4 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Chouriço mouro.
- NP596: 1990 Ed. 2 (2ª edição) pp. 4 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Cacholeira.
- NP597: 1983 Ed. 2 (2ª edição) pp. 5 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Farinheira.
- NP598: 1969 Ed. 1 (1ª edição) pp. 2 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Alheira.
- NP719: 1969 Ed. 1 (1ª edição) pp. 2 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Salame.
- NP720: 1983 Ed. 2 (2ª edição) pp. 7 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Mortadela.
- NP723: 1989 Ed. 2 (2ª edição) pp. 6 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Salsicha fresca.
- NP724: 1979 Ed. 2 (2ª edição) pp. 3 C350/CT35. Norma portuguesa, Carne e produtos cárneos referente a Salsicha tipo "Frankfort".
- Olson, E. R., 1993. Influence of pH on bacterial gene expression. *International Molecular Microbiology*, 8 (1): 5-14.
- Ordóñez, A.I.; F.C. Ibáñez, P. Torre & Y. Barcina, 1997. Formation of biogenic amines in idiazábal ewe's-milk cheese: effect of ripening, pasteurization, and starter. *Journal of Food Protection*, Vol. 60, Nº11: 1371-1375.
- Patarata, L. & C. Martins, 1991. Avaliação da estabilidade de produtos de salsicharia tradicional. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, Vol. LXXXVI, Nº500, Out/Dez: 196-199.
- Patarata, L.; G. Saraiva & C. Martins, 1998. Processos de fabrico de produtos de salsicharia tradicional. I^{as} Jornadas de Queijos e Enchidos - Produtos Tradicionais. Exponor. 83 - 86.pp.
- Paulsen, P. & F. Bauer, 1997. Biogenic amines in fermented sausages. 2. Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented sausages. *Fleischwirtschaft International* (4): 32-34.

- Paulsen, P.; F. Bauer & S. Vali, 1997. Biogenic amines in fermented sausage. 1. Methods for the determination of biogenic amines. *Fleischwirtschaft*, 77(5): 450-452.
- Petäjä, E. & E. Puolanne, 1993. The role of high count of lactic acid bacteria and low count of *Staphylococci* in formation of discolorations in dry sausage. 39th International Congress of Meat Science and Technology. Calgary, Alberta, Canada. S6P12.WP.
- Pezacki, W., 1980. Algunos conocimientos básicos en la elaboración de embutidos secos (crudos). *Fleischwirtschaft* (2): 40 – 41.
- Pinho, O.; J.O. Fernandes; I.M.P.L.V.O. Ferreira; A.M.P. Gomes & M.A. Ferreira, 2000. Aminas biogénicas e os alimentos. *Alimentação Humana*. Vol.6, Nº1: 29-41.
- Pipek, P.; F. Bauer & G. Seiwald, 1992. Formation of histamine in vacuum packed fermented sausages. 38th International Congress of Meat Science and Technology. Clermont-Ferrand, France: 819-822.
- Potthast, K., 1982. Procesos químicos y físicos durante el secado de la carne y de los productos cárnicos. *Fleischwirtsch. Español* 2: 19 - 25.
- Price, N.P.; J.L. Firmin & D.O. Gray, 1992. Screening for amines by dansylation and automated high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 598: 51-57.
- Raemaekers, M. & D. demeyer, 1996. General Introduction. *In*: European AIR Project. AIR2-CT94-1517. Optimisation of endogenous and bacterial metabolism of the improvement of safety and quality of fermented meat products. Proceedings of a workshop at the 42nd International Congress of Meat Science and Technology edited by M. Raemaekers, D. Demeyer. Lillehammer, September 1: 1-5 pp.
- Ramón, D.; I. Molina & J. Flores, 1992. Developement of microbial cultures as starters for spanish dry-cured meat products. *In*: New Technologies for Meat and Meat Products. Ed. By Frans. J. M. Smulders, Fidel Toldrá, José Flores and Miguel Prieto, Ecceamst, Audet Tijdschriften, The Netherlands: 53 - 69.
- Ramsbottom, 1978. *In*: The Science of Meat and Meat Products. J. F. Price y B. S. Schweigert. Food & Nutrition Press, INC.
- Rodel, W.; A. Stiebing & L. Krockel, 1993. Ripening parameters for traditional dry sausages with a mould covering. *Fleischwirtsch*, 73(8): 848-853.
- Roig-Sagués, A. & S. Eerola, 1997. Biogenic amines in meat inoculated with *Lactobacillus sake* starter strains and an amine-positive lactic acid bacterium. *Z. Lebensm Unters Forsch A*. 205: 227-231.
- Roig-Sagués, A. X., M. M. Hernández-Herrero, E. I. López-Sabater, J. J. Rodríguez-Jerez & M. T. Mora-Ventura, 1997. Evaluation of three decarboxylating agar media to detect

- histamine and tyramine-producing bacteria in ripened sausages. *Letters in Applied Microbiology*, 25: 309-312.
- Romero, R.; D. Gázquez; M.G. Bagur & M. Sánchez-Viñas, 2000. Optimization of chromatographic parameters for the determination of biogenic amines in wines by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 871: 75-83.
- Roncalés, P., 1995. Tecnología, cambios bioquímicos y calidad sensorial de los embutidos curados. *Alimentacion, Equipos y Tecnología* - enero/febrero: 73 - 82.
- Roncalés, P.; M. Aguilera; J. A. Beltran; I. Jaime & J. M. Peiro, 1989. Effect of the use of natural or artificial casings on the ripening and sensory quality of dry sausage. 35th International Congress of Meat Science and Technology, Copenhagen, Denmark: 825 - 832.
- Rust, R. E., 1994. Productos embutidos. *In: Ciencia de la carne y de los productos carnicos*. J. F. Price y B. S. Schweigert. Acribia, S.A. 415 - 439 pp.
- Sanchez-Rodas, D.; E. Hohaus & B. Wenclawiak, 1996. High-performance liquid chromatographic determination of primary amines in aqueous solutions after extraction and derivatization with 2,2-diphenyl-1-oxa-3-oxonia-2-boratanaphthalene (DOOB). *J.Anal.Chem.*, 355: 187-189.
- Santos, C.; M. Jalón & A. Mariné, 1985. Contenido de tiramina en alimentos de origen animal. I. Carne, derivados cárnicos y productos relacionados. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 25 (3): 362-368.
- Santos, M. H. S., 1996. Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 29: 213-231.
- Santos, M. H. S., 1998. Amino acid decarboxylase capability of microorganisms isolated in Spanish fermented meat products. *International Journal of Food Microbiology*, 39: 227-230.
- Sarkadi, L.S.; Á. Kovács; E. Hodosi & W.H. Holzapfel, 1999. Biogenic amine content of foods and its relation to microbial activity and food quality. *Cost 917 – Biogenically active amines in food*. Vol III, Part I: 14 – 19 pp.
- Sayem-el-Daher, N.; R. E. Simard & A. G. Roberge, 1984. Extraction and determination of biogenic amines in ground beef and their relation to microbial quality. *Lebensm. Wiss. U. Technol.*, 17: 20-23.
- Schiffner, Oppel & Lortzing, 1996a. Productos curados de larga duración. *In: Elaboración Casera de Carne y Embutidos*. Schiffner. Oppel. Lortzing. Editorial Acribia S.A. 193 - 206 pp.

- Schiffner, Oppel & Lortzing, 1996b. Embutido crudo. *In: Elaboración Casera de Carne y Embutidos*. Schiffner. Oppel. Lortzing. Editorial Acribia S.A. 83 - 110 pp.
- Shahidi, F.; R. Pegg & N. Sem, 1993. Volatile N-nitrosamines nitrite-cured and nitrite-free treated muscle foods. 39th International Congress of Meat Science and Technology, Calgary, Alberta, Canada, Proceedings: S7P30.WP.
- Shalaby, A. R., 1993. Survey on biogenic amines in Egyptian foods: sausages. *Journal of Science and Food Chemistry*, 62: 291-293.
- Shalaby, A.R. & H.A. Abd-el-Rahman, 1995. Effect of potassium sorbate on development of biogenic amines during sausage fermentation. *Die Nahrung* 39 (4): 308-315.
- Shalaby, A.R., 1994. Separation, identification and estimation of biogenic amines in foods by thin-layer chromatography. *Food Chemistry* 49: 305-310.
- Shalaby, A.R., 1996. Biogenic amines significance in food safety and human health. *Food Research International*. Vol. 29, N°7: 675-690.
- Shalaby, A.R., 2000. Changes in biogenic amines in mature and germination legume seeds and their behavior during cooking. *Nahrung* 44, N°1, S.:23-27.
- Sharma, N. & R. Mukhopadhyay, 1992. Processing of fermented sausage using starter cultures. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France: 827-830.
- Simon-Sarkadi, L & E. Hodosi, 1998. Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol II, Part I: 8 – 10 pp.
- Simon-Sarkadi, L., 2000. Biogenic amines and their amino acid precursors in food. Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol IV, Part I: 15 – 19 pp.
- Stanculesco, C.; C. Sandulescu, C. Sbircea & Design, 1970. Variation of compounds resulted from the principal biochemical changes, on zones, during the ripening of raw rumanian sausage. 16^o Congr s des chercheurs en viande, Bulgarie. 1042-1066 pp.
- Standara, S.; M. Vesel  & M. Drd k, 2000. Determination of biogenic amines in cheese by ion exchange chromatography. *Nahrung* 44, N°1, S.: 28-31.
- Standara, S.; P. Pol; J. Kamen & J. Budig, 1994. Formation and content of biogenic amines in czech raw sausages. 40th International Congress of Meat Science and Technology, The Hague, Netherlands, Proceedings: S-VIA.45.
- Steinhart, C. E.; N. E. Doyle & B. A. Cochrane, 1996. Food Safety, Food Research Institute, University of Wisconsin – Madison, New York, Marcel Dekker, Inc. 317-324 pp.
- Stratton, J.; R. Hutkins & S. Taylor, 1991. Biogenic amines in cheese and other fermented foods: a review. *Journal of Food Protection*, Vol. 54, N° 6: 460-470.

- Straub, B. W.; P. S. Tichaczek; M. Kicherer & W. P. Hammes, 1994. Formation of tyramine by *Lactobacillus curvatus* LTH 972. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 199: 9-12.
- Straub, B.; M. Schollenberger; M. Kicherer; B. Luckas & W.P. Hammes, 1993. Extraction and determination of biogenic amines in fermented sausages and other meat products using reversed-phase HPLC. Z. Lebensm. Unters. Forsch., 197: 230-232.
- Szerdahelyi, E. & K. Fischer, 1998. Changes in biogenic amine content in pork meat during storage. Cost 917 – Biogenically active amines in food. Vol II, Part I: 16 – 18 pp.
- Talon, R.; M. C. Montel; J. L. Berdagué & M. Cantonnet, 1992. Biochemical characteristics of dry sausages in relation with starter cultures. 38th International Congress of Meat Science and Technology, Clermont-Ferrand, France: 839-842.
- Taylor, S.L.; E.R. Lieber & M. Leatherwood, 1978. A simplified method for histamine analysis of foods. Journal of Food Science, Vol. 43: 247-250.
- Ten Brink, B; C. Damink; H. M. L. J. Joosten & J. H. J. Huis Veld, 1990. Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11: 73-84.
- Teodorovic, V.; S. Buncic & D. Smiljanic, 1994. A study of factors influencing histamine production in meat. Fleischwirtsch., 74: 170-172.
- Toldrá, F., 1992. The enzymology of dry-curing of meat products. In: New Technologies for meat and meat products. Edited by F. J. M. Smulders, F. Toldrá, J. Flores e M. Prieto. Ecceamst. 209 - 225 pp.
- Townsend, W. E. & D. G. Olson, 1994. Las carnes curadas y su procesado. In: Ciencia de la carne y de los productos cárnicos. J. F. Price y B. S. Schweigert. ACRIBIA, S.A. 393 - 414pp.
- Treviño, E.; D. Beil & H. Steinhart, 1997a. Formation of biogenic amines during the maturity process of raw meat products, for example of cervelat sausage. Food Chemistry, Vol. 60, N° 4: 521-526.
- Treviño, E.; D. Beil & H. Steinhart, 1997b. Determination of biogenic amines in mini-salami during long-term storage. Food Chemistry, Vol. 58, N° 4: 385-390.
- Troller, J.A. & J.H.B. Christian, 1978. Water activity and food. Academic Press, New York.
- Tschabrun, R.; K. Sick; F. Bauer & P. Kranner, 1990. Bildung von histamin in schnittfesten rohwaren. Fleischwirtsch., 70: 448-451.
- Vale, R.S. & B.A. Glória, 1997. Determination of biogenic amines in cheese. Journal of AOAC International. Vol. 80, N°5: 1006-1012.

- Vallé, M. & P. Malle, 1996. Liquid chromatographic determination of fish decomposition indexes from analyses of Plaice, Whiting, and Herring. *Journal of AOAC International*. Vol. 79, N°5: 1134-1140.
- Vallé, M. & P. Malle, 1997. Optimization of a liquid chromatographic method for determination of amines in fish. *Journal of AOAC International*. Vol. 80, N°1: 49-56.
- Vandekerckhove, P., 1977. Amines in Dry Fermented Sausages. *Journal of Food Science*, Vol. 42: 283-285.
- Veciana- Nogués, M. T.; A. Mariné-Font & M. C. Vidal- Carou, 1997. Biogenic amines in fresh and canned tuna. Effects of canning on biogenic amine contents. *J. Agric. Food Chem.*, 45: 4324-4328.
- Veciana-Nogues, M.T.; T. Hernandez-Jover; A. Marine-Font & M.C. Vidal-Carou, 1995. Liquid chromatographic method for determination of biogenic amines in fish and fish products. *Journal of AOAC International*. Vol.78, N°4: 1045-1050.
- Vidal-Carou, M. C.; M. L. Izquierdo, M. C. Martín & A. Mariné, 1990a. Histamina y tyramina en derivados cárnicos. *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.*, 30/1: 102-108.
- Vidal-Carou, M. C.; M. L. Izquierdo-Pulido, M. C. Martín-Morro & Mariné-Font, 1990b. Histamine and tyramine in meat products: relationship with meat spoilage. *Food Chemistry*, 37: 239-249.
- Vignolo, G. M.; A. M. Saad; A. Holgado & G. Oliver, 1988. Nitrite tolerance and nitrite reduction by *Lactobacillus plantarum* strains isolated from dry sausage. *Microbiologie - Aliments - Nutrition*, Vol. 6: 361-365.
- Vinci, G.; A. Ruggieri; E. Iannucci & M.C. D'Alessandro, 1995. Red meat and white meat freshness: quantitative determination of biogenic amines by liquid chromatography. *Euro Food Chem. VIII*, Vol.3: 754-755.
- Waade, C. & L. H. Stahnke, 1997. Dried sausages fermented with *Staphylococcus xylosus* at different temperatures and with different ingredient levels. Part IV. Amino acid profile. *Meat Science*, Vol. 46, N° 1: 101-114.
- Whiting, R. C., 1988. Ingredients and Processing Factors that Control Muscle Protein Functionality. *Food Technology* - April: 104 - 210.
- Wirth, F., 1992. Curado - Formación y conservación del color. *In: Tecnología de los embutidos escaldados*. Editorial Acribia, S.A. 127-133 pp.
- Yen, G.C. & C.L. Hsieh, 1991. Simultaneous analysis of biogenic amines in canned fish by HPLC. *Journal of Food Science*. Vol. 56, N°1: 158-160.

Zaniboni, M.; C. Bersani & C. Cantoni, 1995. Uso delle pediocine nelle tecnologie di fabbricazione di insaccati crudi a breve stagionatura (prima parte). *Ingegneria Alimentare*, I: 20-26.

